

**Stoffwechsel cyanogener Glycoside
in *Linum usitatissimum*:**

Untersuchungen zu Synthese und Transport

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Anja Warnecke-Wundram
aus Hildesheim

1. Referent: Prof. Dr. D. Selmar

2. Referent: Prof. Dr. B. Biehl

eingereicht am: 26.11.2001

mündliche Prüfung (Disputation) am: 28.06.2002

Vorveröffentlichungen

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, Prof. Dr. Dirk Selmar, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge:

Warnecke, A., Selmar, D.: Transport cyanogener Glycoside: Die Glycosylierung des Monoglucosides Linamarin zum Diglucosid Linustatin. Vortrag auf dem Treffen der Sektion Pflanzliche Naturstoffe der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Braunschweig (1997)

Warnecke, A., Selmar, D.: Occurrence of cyanogenic glucosides in cell and tissue cultures of *Linum spec.* (Poster) Tagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Bremen (1998)

***Für Mathias,
Anna und Julia***

Die Experimente zu der vorliegenden Arbeit wurden in der Zeit von Juli 1996 bis August 1999 am Botanischen Institut der Technischen Universität Braunschweig durchgeführt. Teile dieser Arbeit sind als Stipendium im Rahmen der niedersächsischen Graduiertenförderung bzw. von der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen eines Forschungsprogramms von Herrn Prof. Dr. D. Selmar finanziell unterstützt worden.

Herrn **Prof. Dr. D. Selmar** danke ich ganz besonders für die vielen Anregungen, hilfreichen Diskussionen und kritischen Hinweise, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Darüber hinaus möchte ich Ihm für die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes danken.

Herrn **Prof. Dr. B. Biehl** möchte ich für die Übernahme des Korreferates und der stets gewährten Unterstützung Dank sagen.

Bei **Dr. Martin Sagasser** und **Maren Heidbrede**, deren Diplomarbeiten im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, möchte ich mich für die angenehme Zusammenarbeit und das freundschaftliche Verhältnis auch über die Laborwände hinaus bedanken.

Weiterhin möchte ich allen Mitarbeitern des Botanischen Institutes, Abteilung Pflanzenphysiologie, für die Schaffung eines wirklich freundschaftlichen Arbeitsklimas danken. Frau **Daniela Gröger**, Frau **Dagmar Wrann** und Frau **Melanie Butz** gilt darüber hinaus mein besonderer Dank für die stets hervorragende technische Assistenz. Ich danke Frau **Dr. Heike Sarstedt** für die große Unterstützung und die Durchsicht des Manuskriptes und Frau **Dr. Susanne Hillmar** für die angenehme und freundschaftliche Zusammenarbeit.

Frau **Dr. Inna Kuzovkina** vom Timirjazev Institut of Plant Physiology (Moskau) gilt mein Dank für die Überlassung der Wurzelkulturen von *Linum usitatissimum* und *Linum atalante*. Ebenso danke ich Herrn **Prof. Dr. W. Alfermann** für die Bereitstellung von Zellkulturen verschiedener Lein Spezies.

Meiner **Familie** danke ich für ihr Verständnis und ihre Unterstützung ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Ebenso gilt mein Dank allen Freunden, die mir bei der Durchsicht des Manuskriptes geholfen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Ehemann **Mathias**, dessen Geduld und Verständnis in einer oft nicht einfachen Zeit entscheidend zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben. Darüber hinaus unterstützte er mich mit zahlreichen kritischen Diskussionen und der Durchsicht des Manuskriptes.

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|--|------------|
| Abkürzungsverzeichnis | VII |
| 1 Einleitung | 1 |
| 2 Material und Methoden | 11 |
| 2.1 Untersuchungen zur Glycosylierung von Linamarin..... | 11 |
| 2.1.1 Pflanzen..... | 11 |
| 2.1.1.1 Pflanzenanzucht..... | 11 |
| 2.1.1.2 Gewinnung von Samen unterschiedlicher Entwicklungsstadien..... | 11 |
| 2.1.1.3 Trennung der Samenorgane | 11 |
| 2.1.2 Bestimmung von Frisch- und Trockengewicht..... | 12 |
| 2.1.3 Aktivitätsbestimmung der Linamarin : Glucose- Glycosyltransferase | 12 |
| 2.1.3.1 Inkubationsansatz | 12 |
| 2.1.3.2 Extraktion der cyanogenen Glycoside aus dem Reaktionsansatz..... | 13 |
| 2.1.3.3 Nachweis der Radioaktivität in der terminalen Glucose des Linustatins | 13 |
| 2.1.3.3.1 Extraktion des Linustatins aus Flüssigszintillator..... | 13 |
| 2.1.3.3.2 Enzymatische Spaltung des Linustatins durch eine sequentielle Diglucosidase | 14 |
| 2.1.4 Szintillationsspektroskopie..... | 14 |
| 2.1.5 Trennung cyanogener Glucoside durch Hochleistungsflüssig- chromatographie (HPLC)..... | 15 |
| 2.2 Untersuchungen zur Aufnahme cyanogener Glucoside..... | 16 |
| 2.2.1 Pflanzenmaterial | 16 |
| 2.2.1.1 Anzucht steriler Pflanzen | 16 |
| 2.2.1.2 Transformierte Wurzeln | 16 |
| 2.2.2 Medien zur Kallus-, Wurzel und Suspensionskultur..... | 16 |
| 2.2.3 Kallus: Kulturmethoden und -bedingungen..... | 22 |
| 2.2.3.1 Kallusinduktion..... | 22 |
| 2.2.3.2 Kultivierung von Kallus..... | 22 |

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 2.2.4 | Suspensionskulturen: Kulturmethoden und Bedingungen | 23 |
| 2.2.4.1 | Etablierung einer Zellsuspensionskultur aus Kallusgewebe | 23 |
| 2.2.4.2 | Subkultur der etablierten Zellsuspensionskultur | 23 |
| 2.2.5 | Wurzelkulturen..... | 24 |
| 2.2.5.1 | Inkulturnahme von transformierten Wurzeln in Flüssigkeitskultur ... | 24 |
| 2.2.5.2 | Subkultur von transformierten Wurzeln..... | 24 |
| 2.2.6 | Untersuchung der Sterilität und der Vitalität | 25 |
| 2.2.6.1 | Überprüfung der Sterilität von Zellsuspension und Wurzelflüssigkultur (LB-Test)..... | 25 |
| 2.2.6.2 | Fluoresceindiaceetat (FAD)-Test | 25 |
| 2.2.6.3 | Calcofluor white Test | 26 |
| 2.2.7 | Bestimmung der Wachstumsparameter einer Zell- und einer Wurzelkultur von <i>Linum usitatissimum</i>..... | 26 |
| 2.2.7.1 | Animpfen unter Standardbedingungen und Probenahme | 26 |
| 2.2.7.2 | Frischgewichtbestimmung..... | 27 |
| 2.2.7.3 | Trockengewichtsbestimmung | 27 |
| 2.2.7.4 | pH-Wert Bestimmung..... | 27 |
| 2.2.7.5 | Bestimmung der Leitfähigkeit im Nährmedium..... | 27 |
| 2.2.7.6 | Bestimmung der Saccharosekonzentration im Kulturmedium | 28 |
| 2.2.7.7 | Glucosebestimmung..... | 28 |
| 2.2.7.8 | Bestimmung des HCN-Potentials..... | 28 |
| 2.2.7.8.1 | Extraktion der cyanogenen Glycoside..... | 29 |
| 2.2.7.8.2 | Enzymatische Spaltung der cyanogen Glycoside | 29 |
| 2.2.7.8.3 | Cyanidbestimmung..... | 31 |
| 2.2.7.9 | Analyse der cyanogenen Glycoside in Zellkulturen von <i>Linum usitatisiumum</i> | 31 |
| 2.2.7.9.1 | Methanolische Extraktion | 31 |
| 2.2.7.9.2 | Gaschromatographie..... | 32 |
| 2.2.8 | Enzymatische Untersuchungen | 33 |
| 2.2.8.1 | Probenvorbereitung | 33 |
| 2.2.8.1.1 | Zellen und Wurzeln..... | 33 |
| 2.2.8.1.2 | Kulturmedium | 33 |

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 2.2.8.1.3 | Protoplastenpräparation aus Zellsuspensionskultur | 34 |
| 2.2.8.1.4 | Pflanzenorgane | 36 |
| 2.2.8.2 | Linamarase | 36 |
| 2.2.8.3 | Linustatinase | 37 |
| 2.2.8.4 | β -Cyanoalaninsynthase | 39 |
| 2.2.8.5 | Rhodanase | 40 |
| 2.2.8.6 | NADH:Malatdehydrogenase | 42 |
| 2.2.9 | Versuche zur Aufnahme von cyanogenen Glycosiden | |
| | in Zell- und Wurzelkulturen von <i>Linum usitatissimum</i> | 43 |
| 2.2.9.1 | Inkubation der Zell- und Wurzelkulturen mit Linustatin | 43 |
| 2.2.9.1.1 | Inkubation mit Linustatin bei unterschiedlichen pH-Werten | 44 |
| 2.2.9.1.2 | Inkubation mit unterschiedlichen Linustatinkonzentrationen | 44 |
| 2.2.9.1.3 | Inkubation mit Linustatin und weiteren cyanogenen Glycosiden ... | 44 |
| 2.2.9.2 | Probennahme und Probenvorbereitung | 44 |
| 2.2.9.3 | Analyse des aufgenommenen Linustatins über Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) | 45 |
| 3 | Ergebnisse | 46 |
| 3.1 | Nachweis der Glycosylierung von Linamarin | 47 |
| 3.1.1 | Pflanzenmaterial | 47 |
| 3.1.1.1 | Samenentwicklung | 48 |
| 3.1.1.2 | Gehalt cyanogener Glycoside in den Samenorganen | 50 |
| 3.1.2 | Nachweis der Linamarin:Glucose-Glycosyltransferase | 51 |
| 3.1.2.1 | HPLC und Szintillationsspektroskopie der methanolisch extrahierten cyanogenen Glycoside | 52 |
| 3.1.2.2 | Lokalisation der radioaktiven Markierung im Linustatin | 55 |
| 3.2 | Bestimmungen der Aufnahme cyanogener Glucoside | 57 |
| 3.2.1 | Optimierung der Bedingungen zur Kallusinduktion und Kalluskultur | 57 |
| 3.2.1.1 | Kallusinduktion und Selektion eines gut wachsenden Kallus | 58 |
| 3.2.1.1.1 | Kallusinduktion auf L1-Medium | 58 |
| 3.2.1.1.2 | Kallusinduktion auf L2-Medium | 58 |
| 3.2.1.1.3 | Kallusinduktion auf L3-Medium | 59 |

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 3.2.1.1.4 | Kallusinduktion auf L4-Medium..... | 59 |
| 3.2.1.2 | Stammhaltung des Kallus aus <i>Linum usitatissimum</i> | 62 |
| 3.2.2 | Etablierung einer Zellsuspensionskultur aus Kallus von <i>Linum usitatissimum</i> | 63 |
| 3.2.2.1 | Allgemeine Gliederung der Etablierung einer Zellsuspension | 63 |
| 3.2.2.2 | Beschreibung der Etablierungsphasen für eine Zellsuspension aus <i>Linum usitatissimum</i> | 63 |
| 3.2.3 | Beschreibung der Inkulturnahme von transformierten Leinwurzeln in Flüssigkultur | 65 |
| 3.2.4 | Wachstumszyklen der Zellsuspensionskultur und der Wurzelflüssigkultur aus <i>Linum usitatissimum</i> | 68 |
| 3.2.4.1 | Charakterisierung der Suspension aus Kallus | 68 |
| 3.2.4.1.1 | Frisch- und Trockengewicht einer Zellsuspensionskultur aus <i>Linum usitatissimum</i> | 68 |
| 3.2.4.1.2 | Änderungen der Leitfähigkeit und der Saccharose- konzentration im Wachstumsverlauf der Zellsuspensionskultur | 70 |
| 3.2.4.1.3 | Änderungen des pH-Wertes im Wachstumsverlauf der Zellsuspensionskultur | 72 |
| 3.2.4.2 | Charakterisierung der Flüssigkultur aus transformierten Wurzeln. | 74 |
| 3.2.4.2.1 | Frisch und Trockengewicht einer Wurzelflüssigkultur aus <i>Linum usitatissimum</i> | 74 |
| 3.2.4.2.2 | Leitfähigkeit und Saccharosekonzentration im Verlauf des Wachstums einer Wurzelflüssigkultur | 75 |
| 3.2.4.2.3 | Änderungen des pH-Wertes im Wachstumsverlauf der Wurzelflüssigkultur..... | 77 |
| 3.2.5 | Gehalt cyanogener Verbindungen in <i>Linum</i> (HCN-Potenzial) | 78 |
| 3.2.5.1 | Optimierung der Methode zur Bestimmung des HCN-Potenzials .. | 79 |
| 3.2.5.2 | Blausäurepotenzial der Organe von <i>Linum usitatissimum</i> | 83 |
| 3.2.5.3 | Blausäurepotenzial von Zell- und Gewebekulturen verschiedener Leinvarietäten..... | 84 |
| 3.2.5.4 | Blausäurepotenzial der Zellsuspensionskultur von <i>Linum usitatissimum</i> im Verlauf eines Wachstumszyklus | 86 |

| | | |
|--------------|---|------------|
| 3.2.5.5 | Blausäurepotenial der Wurzelflüssigkultur aus <i>Linum usitatissimum</i> im Verlauf eines Wachstumszyklus | 88 |
| 3.2.6 | Spektrum cyanogener Glycoside in Zellsuspensions- und Wurzelflüssigkulturen von <i>Linum usitatissimum</i> | 91 |
| 3.2.6.1 | Überprüfung der gaschromatographischen Meßmethode..... | 92 |
| 3.2.6.2 | Gehalt cyanogener Glycoside in Zellsuspensionen von <i>Linum usitatissimum</i> im Verlauf eines Wachstumszyklus | 93 |
| 3.2.6.3 | Gehalt cyanogener Glycoside in Wurzelflüssigkulturen von <i>Linum usitatissimum</i> | 96 |
| 3.2.7 | Untersuchungen der am Abbau cyanogener Glucoside beteiligten Enzyme | 99 |
| 3.2.7.1 | Linamarase | 101 |
| 3.2.7.2 | Linustatinase | 107 |
| 3.2.7.3 | β -Cyanoalaninsynthase | 112 |
| 3.2.7.4 | Rhodanase | 115 |
| 3.2.7.5 | NADH:Malatdehydrogenase (MDH) als Marker symplastischer Enzyme..... | 115 |
| 3.2.8 | Lokalisierung der Linamarase und Linustatinase auf zellulärem Niveau | 120 |
| 3.2.8.1 | Isolation vitaler Protoplasten aus Zellsuspensionskulturen | 120 |
| 3.2.8.2 | Lokalisierung der Linamarase und Linustatinase in Zellsuspensionen | 121 |
| 3.2.9 | Untersuchungen zur Aufnahme von cyanogenen Glucosiden in die Zellsuspensionen und Wurzelflüssigkulturen | 124 |
| 3.2.9.1 | Aufnahmeversuche mit Zellsuspensionen | 125 |
| 3.2.9.1.1 | Untersuchung der Aufnahme von Linustatin in Abhängigkeit von der Inkubationszeit | 125 |
| 3.2.9.1.2 | Einflusses der Konzentration auf die Aufnahme von Linustatin | 128 |
| 3.2.9.1.3 | Bestimmung der Linustatinaufnahme bei unterschiedlichen pH-Werten im Medium | 131 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 3.2.9.1.4 | Einfluß weiterer Linamarasesubstrate auf die Aufnahme von Linustatin..... | 133 |
| 3.2.9.2 | Aufnahmeversuche mit Wurzelflüssigkulturen | 136 |
| 3.2.9.2.1 | Aufnahme von Linustatin in die Wurzelkulturen in Abhängigkeit der Inkubationsdauer | 136 |
| 3.2.9.2.2 | Einfluß der Konzentration auf die Aufnahme von Linustatin in Wurzelflüssigkulturen..... | 140 |
| 3.2.9.2.3 | Bestimmung der Linustatinaufnahme in Wurzelflüssigkulturen, beeinflusst durch unterschiedliche pH-Werte im Medium..... | 142 |
| 4 | Diskussion | 146 |
| 4.1 | Glycosylierung und Transport - wichtige Punkte im Stoffwechsel cyanogener Glycoside | 146 |
| 4.2 | Kompartimentierung und Mobilisierung cyanogener Glycoside | 146 |
| 4.3 | Glycosyltransferase in <i>Linum usitatissimum</i> | 150 |
| 4.3.1 | Glucosylierung von Linamarin in cyanogenen Pflanzen..... | 151 |
| 4.3.2 | Glycosylierung weitere pflanzlicher Inhaltstoffe | 154 |
| 4.4 | Aufnahme cyanogener Glycoside in Zellen von <i>Linum usitatissimum</i> | 157 |
| 4.4.1 | Induktion der Zell- und Wurzelkulturen | 157 |
| 4.4.2 | Cyanogene Glycoside in Pflanzen, Zell- und Wurzelkulturen von <i>Linum usitatissimum</i> | 158 |
| 4.4.3 | Aufnahme und Transport cyanogener Glycoside in Zell- und Gewebekulturen | 164 |
| 5 | Zusammenfassung | 170 |
| 6 | Literaturverzeichnis | 173 |
| 7 | Abbildungsverzeichnis | 187 |
| 8 | Tabellenverzeichnis | 194 |

VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

| | |
|-------------------|--|
| 2,4-D | 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure |
| B5-Medium | Medium nach Gamborg et al. (1968) |
| BAP | 6-Benzylaminopurin |
| CAH | β -Cyanoalaninhydrolase |
| CAS | β -Cyanoalaninsynthase |
| cpm | counts per minutes |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| FAD | Fluoresceindiacetat |
| FG | Frischgewicht |
| FID | Flammenionisationsdetektor |
| GC | Gaschromatographie |
| HPLC | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie |
| IAA | Indolessigsäure |
| Kinetin | 6-Furfurylaminopurin |
| MDH | Malatdehydrogenase |
| MS-Medium | Medium nach Murashige und Skoog (1962) |
| NADH ₂ | Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid, reduziert |
| p-NPG | p-Nitrophenyl- β -D-glucopyranosid |
| rpm | Umdrehungen pro Minute (rounds per minutes) |
| TG | Trockengewicht |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| UV | Ultraviolett |
| w/v | Masse (weight) pro Volumen (volume) |
| w/w | Masse (weight) pro Masse (weight) |

1 Einleitung

Cyanogene Glycoside sind im Pflanzenreich weit verbreitet. In über 3000 höheren Pflanzenarten sind mehr als 70 verschiedene cyanogene Glycoside beschrieben worden (CONN, 1991). Cyanogene Glycoside sind in ihrer chemischen Struktur α -Hydroxynitrile, die an einem oder mehreren Zuckerresten β -glycosidisch gebunden sind. Dabei handelt es sich zum größten Teil um Monoglycoside¹. Allerdings wurden auch Di- und Triglycoside (NAHRSTEDT et al., 1983) sowie Acyl- und Malonylderivate der cyanogenen Glycoside beschrieben (BRINKER et al., 1989; NAHRSTEDT et al., 1990). Bei der enzymatischen Hydrolyse der cyanogenen Glycoside wird der Zuckeranteil durch β -Glycosidasen abgespalten (CONN, 1980; POULTON, 1990). Die entstehenden α -Hydroxynitrile sind unter physiologischen Bedingungen instabil und zerfallen spontan oder katalysiert durch eine Hydroxynitril-Lyase in die toxische Blausäure und eine verbleibende Carbonylverbindung (HÖSEL, 1981). Neben diesen cyanogenen Glycosiden, aus denen nach Hydrolyse des Zuckers Blausäure frei wird, gibt es eine Reihe von Glycosiden, die zwar eine Cyanogruppe enthalten, aber bei hydrolytischer Spaltung keine Blausäure freisetzen. Diese Glycoside werden mit den cyanogenen Glycosiden unter dem Oberbegriff Cyanglycoside zusammengefasst. Pflanzen, die cyanogene Glycoside enthalten, können bei einer Verletzung Blausäure freisetzen (HUGHES, 1981). Diese Form der Blausäurefreisetzung wird als verletzungsbedingte Cyanogenese bezeichnet und beruht auf der Spaltung der cyanogenen Glycoside durch β -Glycosidasen (Conn, 1980) (Abbildung 1).

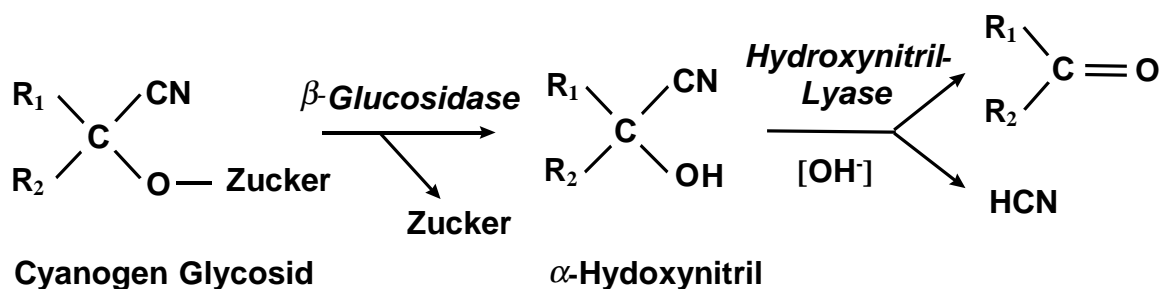


Abbildung 1: Reaktionsschema der pflanzlichen Cyanogenese (CONN, 1980)

¹ Wird das Hydroxynitril durch eine Glucose als Zuckeranteil stabilisiert, wird die Verbindungen als Glucosid bezeichnet.

Die Blausäuremenge, die aus allen cyanogenen Glycosiden einer Pflanze oder einem Gewebe freisetzbar ist, wird als Blausäurepotential (HCN-Potential) bezeichnet (LOYD & GRAY, 1970). In intakten Pflanzen sind die cyanogenen Glycoside in der Vakuole akkumuliert, während die entsprechenden hydrolytischen Enzyme im apoplastischen Bereich der Zellwand lokalisiert sind, so dass keine Cyanogenese stattfindet (ROBINSON, 1930; KOJIMA et al., 1979; GRUHNERT et al., 1994; POULTON & LI, 1994). Erst bei einsetzender Dekompartimentierung im Zuge einer Verletzung erfolgt die Hydrolyse der cyanogenen Glycoside.

Die verletzungsbedingte Cyanogenese ist im Pflanzenreich weit verbreitet und wird sowohl für Angiospermen als auch für Gymnospermen und Pteridophyten beschrieben (CONN, 1991; POULTON, 1990). Unter den beschriebenen Pflanzen befinden sich auch zahlreiche bedeutende Nutzpflanzen wie Mohrenhirse (*Sorghum bicolor* L.), Lein (*Linum usitatissimum* L.), Limabohne (*Phaseolus lunatus* L.), Maniok (*Manihot esculenta* Cranz) und Gerste (*Hordeum vulgare* L.) (CONN, 1991; POULTON, 1990; NAHRSTEDT, 1992; NARTEY, 1980).

Den cyanogenen Glycosiden wird, wie vielen anderen toxischen sekundären Pflanzenstoffen auch, eine Bedeutung als Abwehrstoff („Repellent“) der Pflanze vor potentiellen Fraßfeinden zugeschrieben (NAHRSTEDT, 1985; PROKSCH, 1991). Dies gilt besonders für Pflanzen, in denen große Mengen cyanogener Glycoside akkumuliert werden. Die Repellent-Wirkung der cyanogenen Glycoside geht vermutlich auf die Giftigkeit der bei Gewebeverletzung freiwerdenden Blausäure zurück oder wird möglicherweise auch durch den bitteren Geschmack der Carbonylverbindungen verursacht.

Im Gegensatz zu diesem Selektionsvorteil, stellt sich die Wirkung der cyanogenen Glycoside bei Wechselwirkungen mit Mikroorganismen negativ für die Pflanze dar. So konnte Lieberei (1988) für das Wirt-Pathogen-System *Hevea* sp. - *Microcyclus ulei* zeigen, dass die Pflanze in ihrem eigenen Stoffwechsel durch die Freisetzung von Blausäure weit mehr gehemmt wird, als der Cyanwasserstoff dem Pilz schadet. So führt die nach der Verletzung durch den

Pilz freigesetzte Blausäure zur Schädigung des Gewebes und damit zu einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber dem Schädling (Lieberei et al., 1985).

Neben dieser biochemisch-ökologischen Bedeutung der cyanogenen Glycoside wird eine mögliche Funktion als Transport- und Speicherstoff für reduzierten Stickstoff diskutiert (ROBINSON, 1930; SELMAR, 1988).

Bereits Nartey (1969) beschrieb auf der Grundlage von Studien zur Metabolisierung von radioaktiv markierten Aminosäuren und Blausäure in *Manihot esculenta*, dass die cyanogenen Glycoside einen aktiven Stoffwechsel besitzen, der eng an den freien Aminosäurepool gebunden ist. Ein Abbau von cyanogenen Glycosiden zu anderen nicht cyanogenen Verbindungen wird ebenfalls von Abrol et al. (1966) für *Nandina domestica* aufgezeigt. Bough & Gander (1971) sowie Adewusi (1990) konnten den Turnover des cyanogenen Monoglucosides Dhurrin in Sämlingen von *Sorghum bicolor* nachweisen.

Die Refixierung des Cyanstickstoffs erfolgt in Pflanzengewebe nach einem Modell von Blumentahl et al. (1963) durch eine β -Cyanoalaninsynthase (CAS) und eine β -Cyanoalaninhydrolase (CAH) (siehe Abbildung 2).

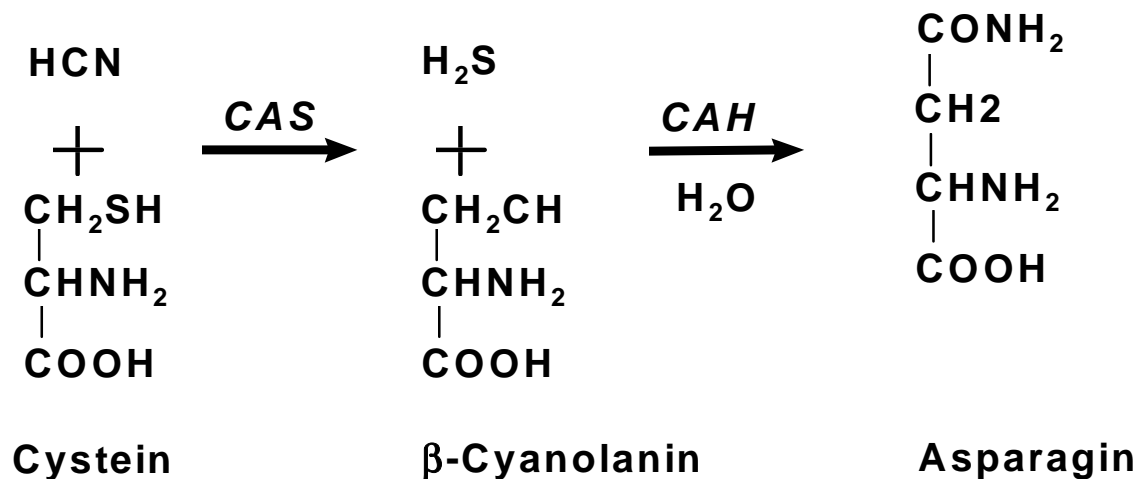


Abbildung 2: Fixierungsmechanismus für Blausäure über die β -Cyanoalaninsynthase und die β -Cyanoalaninhydrolase

Die aus dem cyanogenen Glycosid freiwerdende Bausäure wird von der β -Cyanoalaninsynthase an Cystein gebunden und zu β -Cyanoalanin umgesetzt, welches durch die β -Cyanoalaninhydrolase zu Asparagin hydrolysiert werden kann. Das Asparagin gelangt über Asparaginsäure in den Aminosäurestoffwechsel der Pflanze (CASTRIC et al., 1972).

Auch über die Verlagerung der cyanogenen Glycoside sind zahlreiche Arbeiten veröffentlicht worden. An *Manihot esculenta* wurde gezeigt, dass das cyanogene Monoglucosid Linamarin vorwiegend in den Blättern und Blattstielen synthetisiert wird und in den synthetisch wenig aktiven Geweben der Knolle akkumuliert wird (BEDIAKO et al., 1981). Das bedeutet, dass die cyanogenen Glycoside zum Teil einem Ferntransport, beispielsweise vom Bildungs- in ein Speichergewebe, unterworfen sind. Die Gewebe werden dabei von Clegg et al. (1979) entsprechend der Verlagerungsrichtung als „source“- und „sink“-Gewebe bezeichnet. Diese Autoren wiesen darauf hin, dass sich während der Sämlingsentwicklung von *Phaseolus lunatus* das ursprünglich in den Kotyledonen konzentrierte HCN-Potential in die entwickelnden Organe der Pflanze verlagert, ohne dass sich das HCN-Potential der gesamten Pflanze verändert. Da in dieser Arbeit jedoch die Prüfung fehlt, ob die Pflanze trotz der scheinbaren Unversehrtheit ihres Gewebes Blausäure abgegeben hat, konnte eine Verlagerung der cyanogenen Glycoside nicht eindeutig belegt werden. Die Abnahme des HCN-Potentials in den Keimblättern kann auch auf einen Abbau der cyanogenen Glycoside mit anschließender Blausäurefreisetzung zurückzuführen sein, während der Anstieg des HCN-Potentials in den anderen Geweben durch eine Neusynthese verursacht wurde. Eine tatsächliche Verlagerung von cyanogenen Glycosiden konnte erstmals durch Untersuchungen am Kautschukbaum (*Hevea brasiliensis*) (LIEBEREI, 1984; SELMAR, 1988) nachgewiesen werden.

Während der Sämlingsentwicklung von *Hevea brasiliensis* wird das Endosperm zu Gunsten der sich entwickelnden Kotyledonen reduziert. Im Zuge dieses Prozesses werden Metabolite vom Endosperm in die Kotyledonen verlagert. Da diese beiden Gewebe einen unterschiedlichen genetischen Ursprung haben, müssen die Metabolite den apoplastischen Raum passieren. Auch ein

Langstreckentransport von Stoffen ist innerhalb einer Pflanze in der Regel mit einem teilweise apoplastischen Transport, z.B. im Rahmen der Phloembeladung, verbunden (ERICKSON, 1986). Eine derartige Passage durch den Apoplasten ist dem cyanogenen Monoglycosid Linamarin in *Hevea brasiliensis* nicht möglich, ohne von der dort vorliegenden β -Glucosidase hydrolysiert zu werden. In den Exsudaten des Endosperms und den Blattnektarien, die in ihrer Zusammensetzung stark übereinstimmen, wurde daher kein Linamarin, aber das korrespondierende Diglucosid Linustatin nachgewiesen (SELMAR, 1986). Dieses Diglucosid kann im Gegensatz zum Linamarin von der im Apoplasten vorliegenden β -Glucosidase nicht hydrolysiert werden und wurde daher von Selmar et al. (1987, 1988) als geschützte Transportform des Linamarins definiert.

Der entsprechende Stoffwechselweg cyanogener Glucoside in *Hevea brasiliensis* wurde von Selmar als „Linustatin-Weg“ formuliert. Linustatin muss vor Verlassen des Endosperms durch Glucosylierung des Linamarins entstehen (SELMAR et al., 1987; SELMAR, 1993a). Dieses Diglucosid wird in den Apoplasten abgegeben, in die Kotyledonen der jungen Pflanze aufgenommen und am Zielort durch eine simultane Diglucosidase in Acetoncyanhydrin und Gentiobiose gespalten. Unter physiologischen Bedingungen zerfällt das Acetoncyanhydrin in Aceton und Blausäure, die wie oben dargestellt fixiert werden kann und in den Aminosäurepool der Pflanze eingebracht wird. Auf der Basis von Aufnahmeuntersuchungen mit ^{14}C -Linustatin an Keimlingen von *Hevea brasiliensis* postulierte Selmar (1992) eine Erweiterung dieses Stoffwechselweges. Die Ergebnisse zeigten, dass es nach einer Verlagerung des Linamarins nicht zwangsläufig zur vollständigen Metabolisierung des Glucosides kommen muss, sondern dass die Transportform Linustatin nach erfolgreichem Transport durch eine sequentielle Diglucosidase zu Linamarin konvertiert werden kann, um es im Zielgewebe erneut zu akkumuliert (Abbildung 3).

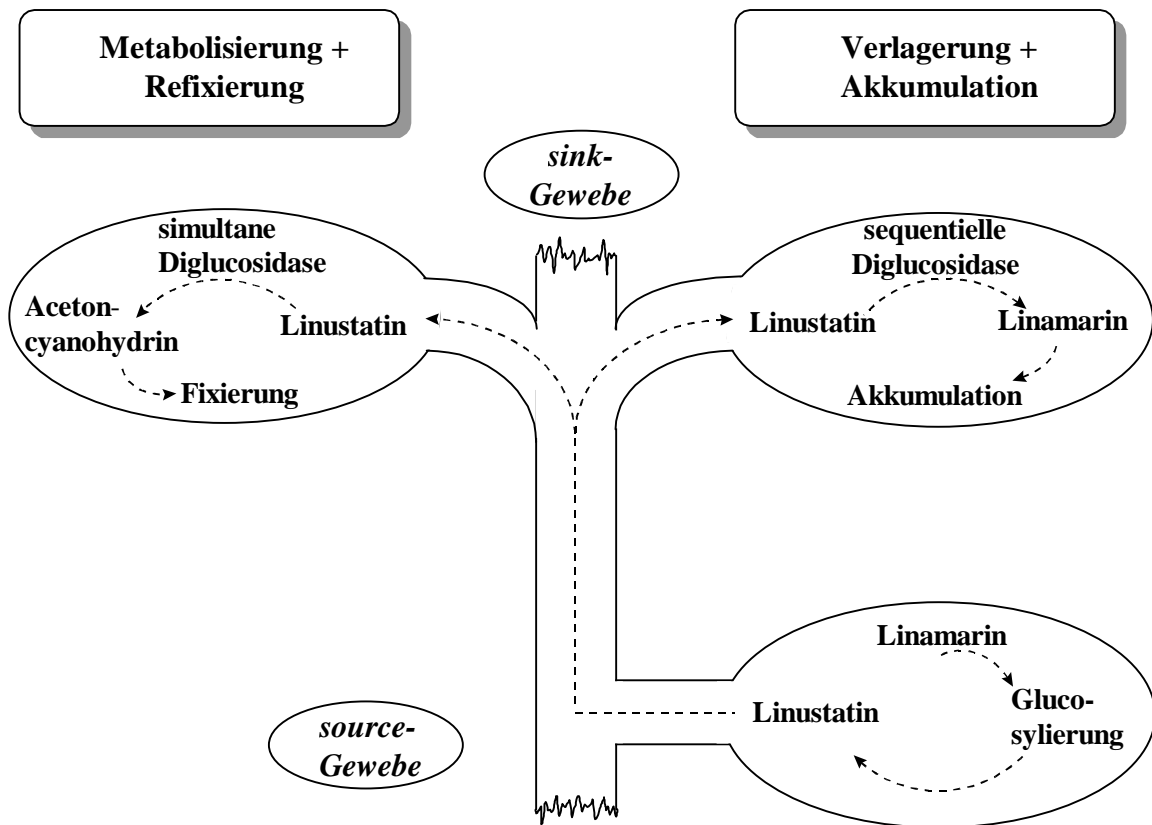


Abbildung 3: Verlagerung und Metabolisierung cyanogener Glycoside in *Hevea brasiliensis*

Das cyanogenen Diglucosid Linustatin steht somit als Transportmetabolit an einem wichtigen Verzweigungspunkt im Stoffwechsel von *Hevea brasiliensis* zwischen Verlagerung und anschließender Akkumulation oder Transport und vollständiger Metabolisierung. Viele Befunde weisen daraufhin, dass der „Linustatin-Weg“ auch in anderen Pflanzen realisiert ist. So wurde nachgewiesen, dass einige der Linamarin akkumulierenden Pflanzen (*Lotus corniculatus*, *Trifolium repens*, *Phaseolus lunatus*, *Manihot esculenta* und *Dimorphoteca sinuata*) im Apoplasten eine Linamarin hydrolysierende β -Glucosidase besitzen, die in diesen Pflanzen wie in *Hevea brasiliensis* einen Transport des Linamarins über den apoplastischen Raum unmöglich macht. Für diese Pflanzen konnte ebenfalls der Transportmetabolit Linustatin bestimmt werden (Übersicht, SELMAR, 1992)

In dem Model des „Linustatin-Weges“ ist die Glucosylierung des Linamarins zum korrespondierenden Diglucosid ein zentraler Schritt bei der Metabolisierung der cyanogenen Glucoside. Trotz umfangreicher Untersuchungen konnte eine

Aktivität einer diese Reaktion katalysierende Glucosyltransferase jedoch noch nicht nachgewiesen werden. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Erfassung einer Linamarin:Glucosyltransferase, die diesen wichtigen Punkt des „Linustatin-Weges“ katalysiert. Solange die Frage nach der Existenz dieses Enzyms unbeantwortet bleibt, ist auch die Funktion von Linustatin als Transportmetabolit, und somit der „Linustatin-Weg“, nicht eindeutig.

Ein indirekter Beleg für die Glucosylierung wurde von Selmar (1992) durch Applikationsversuche mit ^{14}C -Valin an Leinpflanzen erbracht: Das applizierte Valin führte zu einer Synthese von ^{14}C -Linamarin, das in den Blättern der Pflanze akkumuliert und einige Wochen später bei der Fruchtbildung in die Samen verlagert wurde. Im Zuge der Samenreifung wird das Endosperm reduziert und die Kotyledonen entwickeln sich als sekundäres Speicherorgan. Zu diesem Entwicklungszeitpunkt wurden nur noch Spuren an Linamarin nachgewiesen. Die Hauptfraktion der cyanogenen Glycoside wurde durch ^{14}C -Linustatin repräsentiert. Da sowohl die Menge als auch die spezifische Radioaktivität des Linustatins in den reifen Samen mit der des Linamarins in den unreifen Samen übereinstimmten, wurde eine Glucosylierung des Linamarins im Endosperm und anschließende Verlagerung als Linustatin in die Kotyledonen vermutet.

Da in reifen Leinsamen Linustatin in großen Mengen akkumuliert wird und die Untersuchungen von Selmar gute Hinweise auf das Vorkommen einer Linamarin:Glucosyltransferase darstellen, machen *Linum usitatissimum* zu einem geeigneten Objekt, um die Glucosyltransferase erstmals eindeutig nachzuweisen.

Neben der Glucosylierung des Linamarins zum Transportmetaboliten Linustatin ist auch die Aufnahme der Glycoside in die Zellen und Gewebe weitgehend ungeklärt, während die Verlagerung und die Metabolisierung cyanogener Glycoside umfangreich untersucht wurde. Dabei ist besonders interessant zu erfahren, ob die cyanogenen Glycoside tatsächlich als Diglucoside aufgenommen werden und ob nach der Aufnahme eine Umsetzung dieser Glycoside erfolgt oder ob sie zunächst akkumuliert werden. Im Rahmen der Aufnahmestudien wurde der Einfluss der Konzentration des applizierten Cyanglucosides und der pH-Wert im Medium bestimmt, so wie die Wirkung weiterer Glucoside als Co-Substrate.

Untersuchungen zu Klärung der Aufnahme von cyanogenen Glycosiden wurden dadurch erschwert, dass in intakten cyanogenen Pflanzen, wie Selmar et al. zeigen konnten (1988), die cyanogenen Diglucoside in junge Organe transportiert werden, die ein starkes Wachstum und einen sehr aktiven Energie- und Baustoffwechsel aufweisen. Da die Zellen dieser Organe in der Regel bereits relativ hohe endogene Konzentrationen an cyanogenen Glycosiden enthalten, ist eine exakte Differenzierung zwischen diesen und den importierten Glycosiden nur schwer möglich. Zell- und Organkulturen cyanogener Pflanzen enthalten dagegen im allgemeinen nur sehr geringe Konzentrationen an cyanogenen Glycosiden (Hösel et al., 1985; Istock et al., 1990; Jäger et al., 1995). Dieser geringe Gehalt ist häufig auf eine geringere Syntheserate zurückzuführen und nicht auf einen verstärkten Ausstrom der cyanogenen Glycoside, da diese auch im Medium nicht nachweisbar sind. Außerdem ist eine Applikation von cyanogenen Glycosiden über das Medium sehr einfach und effektiv möglich. Suspensionskulturen besitzen wie die jungen Pflanzenorgane einen aktiven Energie- und Baustoffwechsel und haben einen großen Bedarf an Mikro- und Makronährelementen, die sie vollständig über das Medium aufnehmen. Durch die große Zellteilungsrate der Zellen während der exponentiellen und der linearen Wachstumsphase haben sie ähnliche Eigenschaften wie junge Organe, in die ein starker Einstrom von cyanogenen Glycosiden erfolgt.

Mit der Entwicklung von pflanzlichen *in-vitro*-Kulturen wurde versucht diese zur Produktion von pflanzlichen Sekundärstoffen in großem Umfang zu nutzen. Um die Synthese dieser Sekundärstoffe, die besonders in der Pharmazie Verwendung finden sollten, zu beeinflussen, war es notwendig zunächst einige grundlegende Daten über den Stoffwechsel dieser Inhaltsstoffe zu erlangen. Berlin (1988) stellte jedoch fest, dass sich die Sekundärstoffkonzentration in etablierten Zellsuspensionskulturen in der Regel verringert, selbst wenn die Kultur aus Gewebe induziert wurde, das einen sehr hohen Sekundärstoffgehalt besaß. Synthese und Akkumulation sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe sind häufig an die morphologische und anatomische Differenzierung der Gewebe intakter Pflanzen gebunden (WIERMANN, 1981).

Untersuchungen der Zellzyklen verschiedener pflanzlicher Zellkulturen haben gezeigt, dass mit starker Zellvermehrung häufig eine geringere Aktivität des

Sekundärstoffwechsels einhergeht. In einigen Kulturen kommt es während der stationären Phase zu einer gesteigerten Akkumulation von Sekundärstoffen. So erfolgt in einer Zellsuspensionskultur von *Datura stramonium* zu Beginn der stationären Wachstumsphase ein Anstieg der Konzentration des Alkaloids Atropin (BUTTERWORTH-HEINEMANN, 1993). Im Gegensatz dazu bilden und akkumulieren die Zellsuspensionskulturen von *Phytolacca americana* und *Chenopodium rubrum* in der exponentiellen Wachstumsphase verstärkt Betacyane (Heß, 1995).

Während sich zahlreiche Arbeiten mit Alkaloiden, Phenolen und Isoprenoiden beschäftigen, ist über das Vorkommen cyanogener Glycoside in pflanzlichen Zell- und Gewebekulturen nur wenig bekannt.

Da *Linum usitatissimum* sich bereits in zahlreichen Untersuchungen zum Stoffwechsel cyanogener Glycoside als geeignet erwiesen hat, und Gewebekulturen von *Linum usitatissimum* zur Verfügung standen, wurden in dieser Arbeit Zell- und Gewebesuspensionskulturen aus hoch cyanogenem Lein (*Linum usitatissimum*) induziert. Der Wachstumszyklus der Kulturen wurde charakterisiert und das Vorkommen einiger am Cyanidstoffwechsel beteiligten Enzyme untersucht. Bei der Untersuchung der Linamarase und Linustatinase wurde auch die zelluläre Lokalisation dieser Enzyme analysiert. Die so beschriebenen Kulturen wurden für die Untersuchungen der Aufnahme von cyanogenen Glycosiden eingesetzt.

Zwar konnte Selmar et al. den von ihnen postulierten Linustatin-Weg cyanogener Glycoside (1988), der wahrscheinlich auch in vielen anderen cyanogenen Pflanzen Gültigkeit hat, in vielen Teilbereichen bestätigen, doch trotz umfangreicher Untersuchungen blieb der Nachweis einer Linamarin-Glycosyltransferase offen und damit auch ein wichtiger Beweis, dass Linustatin wie im „Linustatin-Weg“ beschrieben als Transportmetabolit fungiert. Auch über den Aufnahmemechanismus der cyanogenen Glycoside in die Zellen ist nichts bekannt. Besonders wichtig wäre dabei zu klären, in welcher Form die cyanogenen Glycoside aufgenommen werden und was nach der Aufnahme in die Zellen mit ihnen geschieht. Diese Befunde könnten klären ob cyanogene Glycoside aus dem nicht plasmatischen Bereich tatsächlich als Diglucoside aufgenommen werden.

Ziel dieser Arbeit war es, die Bildung des Transportmetaboliten Linustatin aus dem Monoglucosid Linamarin und damit das Vorkommen einer Linamarin:-Glucose-Glycosyltransferase eindeutig nachzuweisen. Des weiteren sollte der Import von cyanogenen Glycosiden in pflanzliche Zell- und Gewebekulturen erfasst und grundsätzliche Aussagen zu dessen Mechanismus erarbeitet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchungen zur Glycosylierung von Linamarin

2.1.1 Pflanzen

2.1.1.1 Pflanzenanzucht

Für die Arbeiten mit der Glycosyltransferase wurden Leinsamen unterschiedlicher Entwicklungsstadien verwendet. Zur Gewinnung der Samen wurden Leinpflanzen der Varietät „Arion“ bis zur Fruchtreife kultiviert. Verwendet wurde handelsübliches Saatgut, das dunkel und trocken gelagert wurde. Die Samen wurden zur Keimung zunächst für 12 Stunden unter ständiger Belüftung in Wasser gequollen und anschließend auf Blumenerde ausgelegt. Die Keimungsrate betrug 90 %. Nach ca. 10 Tagen wurden die Pflanzen vereinzelt und weiterhin in Erde kultiviert, sie wurden alle zwei Tage gegossen und alle zwei Wochen mit Nitrophoska® Spezial (Compo GmbH, Münster) gedüngt. Mit 14 Stunden Licht bei 20°C und 10 Stunden Dunkel bei 18°C wuchsen die Pflanzen unter Langtagbedingungen, bei einer Luftfeuchtigkeit von 50 %. Als Lichtquelle dienten Quecksilberdampflampen, die auf Höhe der Pflanzen eine Photonenbestrahlungsstärke von etwa $200 \mu\text{E} \times \text{h}^{-1} \times \text{cm}^{-2}$ erzeugten.

2.1.1.2 Gewinnung von Samen unterschiedlicher Entwicklungsstadien

Nach dreimonatigem Wachstum setzte die Blütenbildung ein. Die Blüten eines Tages wurden untereinander bestäubt und markiert. In bestimmten Zeitabständen wurden die Samenkapseln definierter Altersstufen geerntet und die Samen herauspräpariert. Jede Kapsel enthielt im Durchschnitt 7 Samen.

2.1.1.3. Trennung der Samenorgane

Aus Samen im Alter von 10-25 Tagen nach der Bestäubung wurden die einzelnen Organe isoliert. Dazu wurden die Samen mit einem Skalpell quer durchtrennt und durch leichten Druck auf die Samenschale Endosperm und Kotyledonen vorsichtig getrennt. Dabei traten aus 10-12 Tage alten Samen große Mengen Flüssigkeit aus.

2.1.2 Bestimmung von Frisch- und Trockengewicht

Für die Gewichtsbestimmung wurden Proben aus mindestens 10 Samen verwendet. Es wurden ganze Samen und die daraus gewonnenen Organe eingesetzt. Das Frischgewicht wurde direkt nach der Ernte ermittelt. Zur Bestimmung des Trockengewichtes wurden die Proben bis zu einer Gewichtskonstanz drei Tage lang gefriergetrocknet.

2.1.3 Aktivitätsbestimmung der Linamarin : Glucose-Glycosyltransferase

Die Aktivität der Linamarin-Glukosyltransferase ist nach einer Dekompartimentierung des Gewebes in einem Enzymrohextrakt nicht nachweisbar. Der Nachweis dieses Enzyms und die Bestimmung seiner Aktivität erfolgt daher im intakten Gewebe mit Hilfe eines ^{14}C markierten Substrats. Die quantitative Bestimmung der ins Linustatin eingefügten Radioaktivität ist sehr empfindlich, und ermöglicht das neu gebildete Linustatin von dem zu Beginn der Inkubation vorhandenen endogenen Linustatin zu unterscheiden.

Als radioaktives Substrat für die Inkubationen wurde $[\text{U}]^{14}\text{C}$ -Fruktose-1,6-bisphosphat eingesetzt. Mit Hilfe einer zugesetzten Aldolase wurde diese Hexose zu Glycerinaldehyd-3-phosphat und 3-Hydroxyacetonphosphat gespalten. Diese Triosen können über Phosphattranslokatoren im Antiport mit anorganischem Phosphat (Mohr & Schopfer, 1992) in die Zellen aufgenommen werden, dort zu Glucose metabolisiert und anschließend als radioaktiv markierte Glucose bei der Glycosylierung des Linamarins zum Linustatin von der Glycosyltransferase eingebaut werden.

2.1.3.1 Inkubationsansatz

Nach mehreren Modifikationen der Meßmethode erwies sich der folgende Standardinkubationsansatz zur Bestimmung der Aktivität der Linamarin-Glycosyltransferase als optimal:

12 Tage alte Leinsamen wurden aus den Fruchtkapseln präpariert. Um die Samen vor dem Austrocknen zu schützen und zu vermeiden, dass infolge dessen die Kompartimente des Gewebes beeinträchtigt werden, wurden sie bis zum Beginn der Inkubation in einer Wasserdampf gesättigten Kammer gelagert.

Als Substrat wurden 0,53 μCi der $[\text{U}]^{14}\text{C}$ Fruktose-1,6-bisphosphat (200-250 mCi/mmol) bis zur Trockne eingeeengt und in 1 μL Aldolaselösung (250 U/mL) resuspendiert. Dieses Gemisch wurde mit einer Mikroliterspritze mit Aluminiumnadel in den Samen injiziert, dabei wurde durch die Samenschale gestochen und die Flüssigkeit in das Endosperm entlassen, die Kotyledonen blieben unverletzt. Inkubiert wurde der Same für 12 Stunden bei 30 °C in einer abgeschlossenen wasserdampfgesättigten Kammer. Die Inkubation wurde durch Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff gestoppt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz gefriergetrocknet.

2.1.3.2 Extraktion der cyanogenen Glycoside aus dem Reaktionsansatz

Der gefriergetrocknete Rückstand wurde mit Dichlormethan (3 x 0,5 mL/Same) gewaschen, getrocknet und drei bis vier mal mit dem 10 fachen Volumen Methanol extrahiert. Der methanolische Extrakt wurde bis zur Trockne eingedampft und in 75 μL HPLC Laufmittel (siehe Kapitel 2.1.3.3.1) aufgenommen. Um alle unlöslichen Bestandteile zu entfernen, wurde diese Lösung auf Spartanfilter (Schleicher & Schüll 3/20; 0,45 μm , \varnothing 3 mm) gegeben und durch Zentrifugation (5 min 4.000 x g) filtriert. Der Filter wurde mit 25 μL HPLC-Laufmittel gewaschen und die einzelnen Filtrate vereinigt. Diese Filtrate wurden über HPLC gereinigt und analysiert (Kapitel 2.1.5).

2.1.3.3 Nachweis der Radioaktivität in der terminalen Glucose des Linustatins

Um das radioaktiv markierte Linustatin daraufhin zu untersuchen, welche der Glucosen des Moleküls die ^{14}C Markierung trägt, wurde es nach der Szintillationsmessung aus den Flüssigszintillator zurückgewonnen. Anschließend wurde die terminale Glucose enzymatisch abgespalten und die Radioaktivität in dieser Glucose-Fraktion und der Linamarin-Fraktion bestimmt.

2.1.3.3.1 Extraktion des Linustatins aus Flüssigszintillator

Das bei der Inkubation gebildete Linustatin wurde über die HPLC aus dem Inkubat fraktioniert und die Radioaktivität dieser Fraktion im Szintillationszähler bestimmt. Für eine enzymatische Hydrolyse des Linustatins mußte es aus dem Flüssigszintillator zurückgewonnen werden. Der verwendete Flüssigszintillator

(Quicksafe A, Zinsser Analytic) besteht aus Diisopropylnaphtalin und ist mit 25 %iger Ammoniumsulfatlösung nicht mischbar. Zur Extraktion wurde die Linustatin-Probe mit Ammoniumsulfatlösung (25 % W/W) und Ameisensäureethylester im Verhältnis (2:2:4) vermischt und ausgeschüttelt. Anschließend wurde die Linustatin haltige wässrige Phase abgetrennt, gefriergetrocknet und mit Methanol extrahiert. Nach abdampfen des Methanols wurde die Probe in Mc Ivaine-Puffer (20 mmol/L; pH 5,6) aufgenommen und für die enzymatische Reaktion eingesetzt.

2.1.3.3.2 Enzymatische Spaltung des Linustatins durch eine sequentielle Diglucosidase

Die sequentielle Diglucosidase aus *Hevea brasiliensis* spaltet vom Substrat Linustatin die terminale Glucose ab. Das eingesetzte Enzym wurde von Frau Dr. S. Hillmar zur Verfügung gestellt, es handelte sich um eine Enzymlösung, die mittels Hochsalzextraktion, Ammoniumsulfatfällung Gelfiltration und Kationenaustauscherchromatographie (HILLMAR, 1999) aufgereinigt wurde und keine Aktivität gegenüber Linamarin zeigte. Für die Hydrolyse des Linustatins wurden:

300 µL Linustatinprobe (in 20 mmol/L Mc Ivaine-Puffer; pH 5,6)

50 µL sequentielle Diglucosidase (78,2 pkat/mL)

für drei Stunden bei 30 °C im Wasserbad inkubiert.

Die Reaktion wurde durch Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff abgestoppt und die Probe gefriergetrocknet. Die Spaltprodukte wurden methanolisch aus dem Lyophilisat extrahiert. Nachdem das Methanol abgedampft worden war, wurde der Rückstand in 100 µL HPLC-Fließmittel resuspendiert und über HPLC analysiert (Kapitel 2.1.5.).

2.1.4 Szintillationsspektroskopie

Die Radioaktivität der wässrigen HPLC-Fractionen wurde entweder direkt im Durchflußszintillationsdetektor bestimmt oder die gesammelten Fractionen wurden im Verhältnis 1:1,5 mit Flüssigszintillator (Quicksafe A, Zinsser Analytic) gemischt und das ^{14}C in einem Szintillationszähler im ^{14}C -Fenster bestimmt.

Eventuelles Quenching durch Lösungsmittel wird durch das Zählen eines [U] ^{14}C Fruktose-1,6-bisphosphat-Standards unter gleichen Bedingungen ausgeglichen, 80-90 % des eingesetzten ^{14}C wurde in den Fraktionen wiedergefunden.

2.1.5 Trennung cyanogener Glucoside durch Hochleistungs-flüssigchromatographie (HPLC)

Die während der Inkubation mit der Linamarin-Glucosyltransferase gebildeten radioaktiven Reaktionsprodukte wurden mittels HPLC von den eingesetzten radioaktiv markierten Zuckern abgetrennt. Dabei wurde die Fraktion, welche zwischen 4 und 8 Minuten eluiert, aufgefangen und anschließend mit Hilfe einer Vakuumzentrifuge mit Kühlfalle eingengt. Diese Fraktion, die während der Retentionszeit von Linamarin und Linustatin gesammelt wurde, wurde erneut in Fließmittel resuspendiert und ein weiteres Mal über die HPLC-Analyse fraktioniert. Folgendes System wurde dazu verwendet:

Säulenkörper: Länge 25 cm, Durchmesser 0,4 cm, mit Vorsäule

Säulenmaterial: RP-18 (Macherey und Nagel), Partikelgröße 5 μm

Laufmittel: 7 % Methanol

Fluß: 1mL/min

Detektor: Brechungsindex und Durchflußszintillationszähler.

Die Retentionszeit von Linamarin beträgt 6,5 min und die von Linustatin 8,3 min.

Die Säule wurde nach jeder Probe dreimal mit je 200 μL Methanol gewaschen.

Diese Waschfraktion wurde immer auf ihren Gehalt an Radioaktivität untersucht.

Die Radioaktivität wurde entweder direkt im Durchflußszintillationsdetektor bestimmt oder die nach Detektion des Brechungsindex gesammelten Fraktionen wurden für die Szintillationszählung verwendet (Kapitel 2.1.4)

2.2 Untersuchungen zur Aufnahme cyanogener Glucoside

2.2.1 Pflanzenmaterial

2.2.1.1 Anzucht steriler Pflanzen

Das Ausgangsmaterial für die Gewinnung einer Zellkultur waren Leinpflanzen der Varietät „Arion“. Zur Anzucht der Pflanzen wurde handelsübliches Saatgut, das dunkel und trocken gelagert wurde, verwendet. Zunächst wurden die Samen zwei Minuten in 70 %igen Ethanol oberflächendesinfiziert und anschließend mit sterilem Wasser 8 Minuten gespült. Danach wurden sie für 10 Minuten mit Calciumhypochloridlösung (10 %, w/w) desinfiziert und erneut mit sterilem Wasser gewaschen. Die Samen wurden zur Keimung in 500 mL Einweckgläsern mit einem modifizierten MS-Basalmedium (MURASHIGE U. SKOOG, 1962) ohne Phytohormone (Kapitel 2.2.2) ausgelegt und mit 14 Stunden Licht bei 20°C und 10 Stunden Dunkel bei 18°C unter Langtagbedingungen gehalten. Die Ausbeute an sterilen Pflanzen durch diese Methode betrug 95 %.

2.2.1.2 Transformierte Wurzeln

Die in diese Arbeit verwendeten Wurzelkulturen von *Linum usitatissimum* und *Linum atalante* wurden von Frau Dr. Inna Kuzovkina vom K.A. Timirjazev Institut für Pflanzenphysiologie, Moskau, zur Verfügung gestellt. Sie wurden mit *Agrobacterium rhizogenes* (Stamm LBA9402) transformiert. Zu Beginn der Untersuchungen lagen die transformierten Wurzeln beider Stämme als langsam wachsende Kulturen auf verfestigtem Medium vor. Für die Versuche mit den Wurzelkulturen wurden sie in Flüssigkultur überführt.

2.2.2 Medien zur Kallus-, Wurzel und Suspensionskultur

In dieser Arbeit wurden für die Kallus und Zellsuspensionskulturen modifizierte MS-Basalmedien (siehe Tabelle 1) und für die Wurzelkulturen MS-Basalmedien mit reduziertem Stickstoffgehalt und B5-Basalmedien (siehe Tabelle 2-4) verwendet. Der pH-Wert der Medien wurde vor dem Autoklavieren (20 min; 1,2 bar; 121°C) mit 1 molarer Kalilauge auf pH 5,7 eingestellt. Die Phytohormone wurden sterilfiltriert und den Medien nach dem Autoklavieren zugesetzt. Zur Kultivierung von Kallus und Wurzeln auf festem Substrat wurde dem entsprechenden Medium 0,9 % Agar-Agar zugesetzt.

Tabelle 1: Zusammensetzung des MS-Basalmediums

Dieses Medium wurde für die Kallus- und Zellsuspensionskultur von *Linum usitatissimum* und für die Anzucht von sterilen Leinpflanzen eingesetzt.

| Makronährelemente | g/L | mmol/L |
|---|--------------|---------------|
| NH ₄ NO ₃ | 1,65 | 20,6 |
| KNO ₃ | 1,90 | 18,8 |
| CaCl ₂ | 0,38 | 3,4 |
| MgSO ₄ x 7 H ₂ O | 0,37 | 1,5 |
| KH ₂ PO ₄ | 0,17 | 1,2 |
| Mikronährelemente | mg/L | µmol/L |
| MnSO ₄ x H ₂ O | 17 | 100 |
| H ₃ BO ₃ | 6,2 | 100 |
| ZnSO ₄ x 7 H ₂ O | 8,6 | 30 |
| Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O | 0,25 | 1 |
| CuSO ₄ X 5 H ₂ O | 0,025 | 0,1 |
| CoCl ₂ X 6 H ₂ O | 0,025 | 0,1 |
| KJ | 0,83 | 5 |
| Na ₂ EDTA | 37,3 | 100 |
| FeSO ₄ x 7 H ₂ O | 27,8 | 100 |
| Organische Bestandteile | mg/L | mmol/L |
| Saccharose | 30.000 | 87,6 |
| Glycin | 2 | 22,5 |
| Vitamine | mg/L | µmol/L |
| Nicotinsäure | 0,5 | 4,06 |
| Pyridoxin-HCl | 0,5 | 2,43 |
| Thiamin-HCl | 0,1 | 0,30 |
| myo-Inosit | 100 | 555 |
| Agar-Agar | 9.000 | |

Tabelle 2: Zusammensetzung des B5-Basalmediums

Dieses Medium wurde für die Kultur von transformierten Wurzeln von *Linum atalante* in Flüssigkultur und auf Petrischalen eingesetzt.

| Makronährelemente | g/L | mmol/L |
|---|--------------|---------------|
| NH ₄ NO ₃ | 0,13 | 1,67 |
| KNO ₃ | 2,50 | 24,7 |
| CaCl ₂ | 0,15 | 1,4 |
| MgSO ₄ x 7 H ₂ O | 0,25 | 1,01 |
| NaH ₂ PO ₄ | 0,15 | 0,96 |
| Mikronährelemente | mg/L | µmol/L |
| MnSO ₄ x H ₂ O | 10 | 66,2 |
| H ₃ BO ₃ | 3 | 50 |
| ZnSO ₄ x 7 H ₂ O | 2 | 7 |
| Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O | 0,25 | 1 |
| CuSO ₄ X 5 H ₂ O | 0,025 | 0,1 |
| CoCl ₂ X 6 H ₂ O | 0,025 | 0,1 |
| KJ | 0,85 | 5 |
| Na ₂ EDTA | 37,3 | 100 |
| FeSO ₄ x 7 H ₂ O | 27,8 | 100 |
| Organische Bestandteile | mg/L | mmol/L |
| Saccharose | 20.000 | 58,4 |
| Vitamine | mg/L | µmol/L |
| Nicotinsäure | 1 | 8,1 |
| Pyridoxin-HCl | 1 | 4,5 |
| Thiamin-HCl | 10 | 30 |
| myo-Inosit | 100 | 555 |
| Agar-Agar | 9.000 | |

Tabelle 3: Zusammensetzung des MS-Basalmediums mit reduzierten Stickstoffgehalt für Kultivierung in Flüssigkultur (1/2MS_s)

Dieses Medium wurde für Wurzelkulturen von *Linum usitatissimum* in Flüssigkultur eingesetzt.

| Makronährelemente | g/L | mmol/L |
|---|-------------|---------------|
| NH ₄ NO ₃ | 0,825 | 10,3 |
| KNO ₃ | 0,950 | 9,4 |
| CaCl ₂ | 0,380 | 3,4 |
| MgSO ₄ x 7 H ₂ O | 0,370 | 1,5 |
| KH ₂ PO ₄ | 0,170 | 1,2 |
| Mikronährelemente | mg/L | µmol/L |
| MnSO ₄ x H ₂ O | 17 | 100 |
| H ₃ BO ₃ | 6,2 | 100 |
| ZnSO ₄ x 7 H ₂ O | 8,6 | 30 |
| Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O | 0,25 | 1 |
| CuSO ₄ X 5 H ₂ O | 0,025 | 0,1 |
| CoCl ₂ X 6 H ₂ O | 0,025 | 0,1 |
| KJ | 0,83 | 5 |
| Na ₂ EDTA | 37,3 | 100 |
| FeSO ₄ x 7 H ₂ O | 27,8 | 100 |
| Organische Bestandteile | mg/L | mmol/L |
| Saccharose | 20.000 | 58,4 |
| Vitamine | mg/L | µmol/L |
| Nicotinsäure | 0,5 | 4,06 |
| Pyridoxin-HCl | 0,5 | 2,43 |
| Thiamin-HCl | 0,1 | 0,30 |
| myo-Inosit | 100 | 555 |

Tabelle 4: Zusammensetzung des MS-Basalmediums mit reduzierten Stickstoffgehalt für Kultivierung auf Petrischalen (1/2MS_P)

Dieses Medium wurde für Wurzelkulturen von *Linum usitatissimum* auf Petrischalen eingesetzt.

| Makronährelemente | mg/L | mmol/L |
|--|--------------|---------------|
| KNO ₃ | 80 | 0,8 |
| Ca(NO ₃) ₂ x 4 H ₂ O | 288 | 1,2 |
| KCl | 65 | 0,9 |
| MgSO ₄ x H ₂ O | 731 | 5,2 |
| KH ₂ PO ₄ | 4,8 | 0,04 |
| Mikronährelemente | | µmol/L |
| H ₃ BO ₃ | 1,5 | 24 |
| ZnSO ₄ x 7 H ₂ O | 2,65 | 0,09 |
| Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O | 0,0025 | 0,01 |
| CuSO ₄ X 5 H ₂ O | 0,13 | 0,52 |
| KJ | 0,75 | 4,5 |
| MnCl ₂ x 4 H ₂ O | 6 | 30 |
| Na ₂ EDTA | 37,3 | 100 |
| FeSO ₄ x 7 H ₂ O | 27,8 | 100 |
| Organische Bestandteile | mg/L | mmol/L |
| Saccharose | 20.000 | 58,4 |
| Vitamine | mg/L | µmol/L |
| Nicotinsäure | 0,5 | 4,06 |
| Pyridoxin-HCl | 0,1 | 0,49 |
| Thiamin-HCl | 0,1 | 0,30 |
| myo-Inosit | 100 | 555 |
| Agar-Agar | 9.000 | |

Tabelle 5: Übersicht über die zur Kallusinduktion verwendeten Medien

- 1) nach Schaumann et. al., (1993): Die Konzentrationen an Mikronährelementen, organischen Bestandteilen und Vitaminen entsprechen dem MS Basalmedium (Tabelle 1), die Konzentrationen an Makronährelementen ist um die Hälfte reduziert und es wurde 4 µM Casein zugesetzt.
- 2) Die Konzentrationen an Mikronährelementen, organischen Bestandteilen und Vitaminen entsprechen dem L1, es wurde kein Casein zugesetzt.
- 3) MS-Basalmedium mit reduzierten Stickstoffgehalt (1/2MS_S, siehe Tabelle 3).
- 4) MS Basalmedium (Tabelle 1)

| Medium | Konzentration der Phytohormone [µM] | | |
|-------------------|-------------------------------------|-------|------|
| | Kinetin | 2,4-D | IAA |
| L 1 ¹⁾ | 16 | 5 | 0 |
| L 2 ²⁾ | 16 | 5 | 0 |
| L 3 ³⁾ | 0,9 | 1,8 | 22,9 |
| L 4 ⁴⁾ | 0,9 | 0,45 | 11,4 |

Tabelle 6: Medien zur weiteren Kultur des erfolgreich induzierten Kallus

- 1) MS-Basalmedium mit reduziertem Stickstoffgehalt (1/2MS_S siehe Tabelle 3)
- 2) MS Basalmedium (siehe Tabelle 1)

| Medium | Konzentration der Phytohormone [µM] | | | |
|---------------------|-------------------------------------|-------|-----|------|
| | Kinetin | 2,4-D | BAP | IAA |
| L 3.1 ¹⁾ | 0,9 | 0,9 | 0 | 22,9 |
| L 3.2 ¹⁾ | 0,9 | 0,9 | 0 | 17,1 |
| L 3.3 ¹⁾ | 0,9 | 0,45 | 0 | 11,4 |
| L 4.1 ²⁾ | 0,9 | 0,9 | 0 | 11,4 |
| L 4.2 ²⁾ | 0,9 | 0,9 | 5 | 11,4 |
| L 4.3 ²⁾ | 0,9 | 1,8 | 5 | 11,4 |

2.2.3 Kallus: Kulturmethoden und -bedingungen

2.2.3.1 Kallusinduktion

Zur Induktion wurden die Internodienabschnitte der steril angezogenen Leinpflanzen (Sorte „Arion“, siehe Kapitel 2.2.1.1) verwendet. Sie wurden in 1 cm große Abschnitte geteilt, längs geschnitten und mit der Schnittfläche auf dem Nährmedium ausgelegt. Dabei wurden 20 Explanate auf eine Petrischale (Ø 9 cm) mit verfestigtem Medium verteilt. Um ein Austrocknen der Gewebestücke zu vermeiden, wurden die Gewebeexplanate zum Schneiden auf ein mit sterilem Wasser getränktes Filterpapier gelegt.

Für die Kallusinduktion wurden sowohl die Stickstoffgehalte des MS-Basalmediums als auch die Konzentration verschiedener Phytohormonkonzentrationen variiert (siehe Tabelle 5).

Die Kallusinduktion sowie die spätere Stammhaltung erfolgte bei 26°C im Dunkeln.

2.2.3.2 Kultivierung von Kallus

Nachdem sich steriler Kallus gebildet hatte, wurde dieser mit einem Skalpell von den Gewebeexplanaten abgetrennt und auf frisches Nährmedium überführt. Die erste Passage erfolgte entweder auf das Induktionsmedium oder auf ein Medium, das eine vom Induktionsmedium abweichende Makronährelementzusammensetzung und/oder eine Phytohormonzusammensetzung enthält (siehe Tabelle 6).

Die Passage von Kallus auf frisches Nährmedium erfolgte, sobald sich die Größe des Kallus verdoppelt hatte, oder eine beginnende Gewebeverbräunung eingesetzt hatte. Auf jede Petrischale wurden 10 Kallusstücke ausgelegt. Zeigte der Kallus ein gutes Wachstum, wurde er weiterhin auf diesem Medium kultiviert. Wuchs er nur schlecht, wurde die Medienzusammensetzung variiert. Das Wachstum des Kallus wurde dabei nach folgenden Kriterien beurteilt und der Kallus für die Induktion einer Zellsuspensionskultur selektiert:

- a) das Kallusgewebe verdoppelt sich innerhalb von 21 Tagen
- b) das Gewebe ist schnittfest, aber nicht hart

c) es hat eine gelbliche Farbe und zeigt keine Verbräunung.

Zur Stammhaltung des gut wachsenden Kallus wurde dieser im 3 Wochenrhythmus auf frisches Medium passagiert. Dazu wurden 5 Kallusstücke (5 mm) auf je eine Petrischale mit L4.3 Medium umgesetzt.

2.2.4 Suspensionskulturen: Kulturmethoden und Bedingungen

2.2.4.1 Etablierung einer Zellsuspensionskultur aus Kallusgewebe

Um eine Zellsuspensionskultur von *Linum usitatissimum* anzulegen, wurde Kallus vom festen Kulturmedium (L4.3, siehe Tabelle 6) abgenommen und in L4.3-Flüssigmedium überführt.

Dazu wurde Kallus ausgewählt, der sehr gut wuchs und der eine feste, feinkrümelige Struktur aufwies.

Die Kallusstücke zweier Petrischalen (18 Stück, 2 g Frischgewicht) wurden mit einer Pinzette vom festen Kulturmedium abgenommen und auf eine leere Petrischale gegeben. Der Kallus wurde nun mit einem Spatel zerdrückt und die feinen Kallusstücke wurden in einen 200 mL Weithalserlenmeyerkolben mit 60 mL Flüssigmedium überführt. Die Kolben wurden mit Alufolie verschlossen und auf einem Rotationsschütter mit 120 rpm bei 26°C im Dunkel kultiviert.

Nach 10 Tagen hatte sich feines Zellmaterial von den Kallusstücken abgelöst.

Um die großen Zellaggregate abzutrennen wurde der Inhalt zweier Erlenmeyerkolben abgesiebt und die auf dem Nylonsieb (Porengröße 2 mm) zurückbleibenden Zellen verworfen. Nach Sedimentation der Zellen im Filtrat wurde mit einer Pipette das überstehende Medium abgezogen und durch 60 mL neues Flüssigmedium ersetzt. Diese Prozedur wurde im Abstand von 10 Tagen mehrmals wiederholt, bis sich eine gut wachsende Zellsuspensionskultur gebildet hatte.

2.2.4.2 Subkultur der etablierten Zellsuspensionskultur

Die etablierte Zellsuspensionskultur wurde im 14-Tage-Rhythmus auf L4.3-Medium kultiviert. Dazu wurden mit einem Netzlöffel Einzelzellen sowie kleine und große Zellaggregate (bis 3 mm) aus dem aufgeschüttelten Kolben entnommen und in einen Kolben mit frischem Medium transferiert (ca. 2 g Frischmasse/60 mL

Medium). Die Kolben wurden mit Alufolie verschlossen und auf einem Rotationschütter mit 120 rpm bei 26°C im Dunkeln gezüchtet.

2.2.5 Wurzelkulturen

2.2.5.1 Inkulturnahme von transformierten Wurzeln in Flüssigkultur

Die in dieser Arbeit verwendeten Wurzelkulturen von *Linum usitatissimum* und *Linum atalante* stammen von Frau Dr. Inna Kuzovkina vom K.A. Timirjazev Institut für Pflanzenphysiologie, Moskau und wurden als langsam wachsende Kulturen auf festem Medium in Petrischalen zur Verfügung gestellt. Zur Überimpfung in Flüssigmedium wurden 250 mL Weithalserlenmeyerkolben mit 60 mL Flüssigmedium versehen und mit 1 g Wurzeln (Frischgewicht) angeimpft. Die Kolben wurden mit Alufolie verschlossen und auf einem Rotationsschüttler mit 100 rpm bei 26°C im Dunkel kultiviert.

Der Stamm *Linum usitatissimum* wurde in Flüssigkultur in einem MS-Basalmedium ohne Glycin und mit reduzierter Stickstoffquelle gehalten (Tabelle 3). Zusätzlich wurden Wurzelstücke in Petrischalen mit einem modifizierten MS-Basalmedium als Stammhaltung kultiviert (Tabelle 4). Der Stamm *Linum atalante* wächst sowohl in Flüssigkultur als auch auf Petrischalen in einem B5-Medium (GAMBORG et al., 1968) (Tabelle 2). Beide Wurzelkulturen benötigen keinen Zusatz von Phytohormonen.

2.2.5.2 Subkultur von transformierten Wurzeln

Nachdem die Wurzeln in der Flüssigkultur gutes Wachstum zeigten, wurden sie im Abstand von drei Wochen passagiert. Dabei wurde während eines Wachstumszyklus nach 14 Tagen ca. 40 mL frisches Medium zugegeben.

Um die Kulturen zu überimpfen, wurde die gewachsene Wurzelmasse mit einer Pinzette aus dem Kolben entnommen und meristematische Randbereiche mit dem Skalpell abgetrennt, die dann zum Animpfen eines neuen Kolbens mit frischem Medium dienten.

2.2.6 Untersuchung der Sterilität und der Vitalität

Zu Beginn der Kultivierung von Zellen und Wurzeln in Suspension bzw. Flüssigkultur wurde in regelmäßigen Abständen die Sterilität überprüft. Später erfolgten diese Untersuchungen nur bei Verdacht auf Kontamination.

Außerdem wurde zur Beurteilung der Medienmodifikationen die Vitalität der Zellen in den Suspensionen getestet.

2.2.6.1 Überprüfung der Sterilität von Zellsuspension und Wurzelflüssigkultur (LB-Test)

Bei dieser Untersuchung wurde ein Aliquot der Suspensionen bzw. Flüssigkulturen in einem Medium zur Bakterienkultivierung (nach Lucca-Bertani (LB), modifiziert nach Sambrook et al., 1989).

LB-Medium für Bakterien: 10 g/L Pepton aus Casein

5 g/L Hefeextrakt

5 g/L NaCl

pH-Wert: 7,2

20 mL LB-Medium wurden mit 0,5 mL der zu testenden Suspension bzw. Flüssigkulturen versetzt. Dieser Ansatz wurde unter Schütteln für 48 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Eine Trübung des Mediums zeigte die Kontamination durch Bakterien an.

2.2.6.2 Fluoresceindiacetat (FAD)-Test

Fluoresceindiacetat wird in die Zellen aufgenommen und dort von unspezifischen Esterasen zu Fluorescein und Acetat gespalten. Im Gegensatz zu FAD kann Fluorescein die intakten Membranen nicht passieren und wird somit in lebenden Zellen angereichert. Die auf das Fluorescein zurückgehende Grünfluoreszenz bei der Bestrahlung mit UV-Licht kann demnach als Maß für die Vitalität der Zellen gewertet werden.

Stammlösung FAD: 0,5 % w/v in Aceton

Saccharoselösung: 0,5 mL/L in Wasser (sterilfiltriert)

1 mL Saccharoselösung wurde mit 3 Tropfen FAD-Lösung versetzt. Diese verdünnte Lösung wurde in einem Petrischalendeckel mit der Zellsuspension im Verhältnis 1:1 vermischt. Nach etwa 3 Minuten zeigten die lebenden Zellen eine Grünfluoreszenz (WIDHOL, 1972). Durch den Vergleich der Erscheinungsbilder bei Durchlichtmikroskopie und unter Fluoreszenzbedingungen, konnte der Anteil lebender Zellen bestimmt werden.

2.2.6.3 Calcofluor white Test

Calcofluor white ist ein Textilaufheller, der spezifisch an β -1,4-Glucane bindet. Er fluoresziert intensiv bei UV-Bestrahlung. Diese Färbung wird zum Nachweis von Cellulose eingesetzt (O'BRIEN T.P. & MC CULLY M.E., 1981).

Calcofluor-Lösung: 0,1 % w/v in Medium

Um die Vitalität der Zellen zu kontrollieren und zu prüfen, ob die protoplastierten Zellen zellwandfrei sind, wurde die Zellsuspensionskultur/Protoplastenlösung und die Färbelösung im Verhältnis 1:1 gemischt und die Lösung im UV-Licht-Photometer betrachtet.

2.2.7 Bestimmung der Wachstumsparameter einer Zell- und einer Wurzelkultur von *Linum usitatissimum*

Der Wachstumszyklus wurde für die Zellsuspensions- und für die Wurzelflüssigkultur untersucht. Beide Kulturen wurden vor Beginn der Untersuchungen über längere Zeit (Zellkultur: 3 Monate; Wurzelkultur: 4,5 Monate) unter konstanten Bedingungen auf den oben genannten Medien kultiviert (Kapitel 2.2.4.2 und 2.2.5.2).

2.2.7.1 Animpfen unter Standardbedingungen und Probenahme

Zum Animpfen der Kolben wurde Zell-, bzw. Wurzelmaterial verwendet, das sich am Ende einer Kulturperiode befand und letztmalig 14 bzw. 21 Tage zuvor in frisches Medium umgesetzt worden war. Um die Sterilität zu kontrollieren wurde von jedem neu angeimpften Kolben ein LB-Test durchgeführt. Kontaminierte Kolben wurden in die Untersuchung nicht mit einbezogen.

Nachdem die Zellen und die Wurzeln mit einem Sieb vom Medium getrennt worden waren, wurden je 2,5 g Zellen bzw. 1 g Wurzeln (Frischmasse) mit 60 mL Medium in einem 250 mL Erlenmeyerkolben angeimpft. Die Kolben wurden anschließend im Dunkeln bei 27°C geschüttelt.

Zur Bestimmung der Wachstumsparameter wurden ab dem 2. Kulturtag jeweils 2-3 Kolben parallel geerntet. Die weiteren Probenahmen erfolgten im Abstand von 1-2 Tagen über einen Zeitraum von 20 bzw. 22 Tagen. Sowohl von den Zellsuspensions- wie von den Wurzelflüssigkulturen wurden je drei Wachstumszyklen untersucht.

2.2.7.2 Frischgewichtbestimmung

Zur Bestimmung des Frischgewichtes wurde das Zell- bzw. Wurzelmaterial der Suspensionen bzw. Flüssigkulturen unter Vakuum (Wasserstrahlpumpe) abfiltriert. Anschließend wurde das Frischgewicht auf einer Oberschalenwaage bestimmt. Das Zell- und Gewebematerial wurde unmittelbar danach in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Gefriertocknung bei -70 °C gelagert.

2.2.7.3 Trockengewichtsbestimmung

Um das Trockengewicht der Zellen und Wurzeln zu bestimmen, wurde das gefrorene Probenmaterial in Aluminiumtiegel bis zur Gewichtskonstanz gefriergetrocknet. Anschließend wurde das Trockengewicht auf einer Analysenwaage bestimmt. Die Konstanz des Trockengewichts war nach 1-3 Tagen erreicht.

2.2.7.4 pH-Wert Bestimmung

Der pH-Wert des Mediums wurde im Verlauf des Wachstums mit Hilfe einer pH-Elektrode bestimmt. Die Messung des pH-Werts erfolgte unter ständigem schütteln im abfiltrierten Medium.

2.2.7.5 Bestimmung der Leitfähigkeit im Nährmedium

Das filtrierte Medium wurde mittels einer Leitfähigkeitselektrode auf seine Leitfähigkeit untersucht. Die Messung erfolgte unmittelbar nach der Probenahme bei Raumtemperatur.

2.2.7.6 Bestimmung der Saccharosekonzentration im Kulturmedium

Um den Verbrauch der Kohlenstoffquelle im Wachstumsverlauf zu beschreiben, wurde die nicht verbrauchte Saccharose im filtrierten Medium durch eine Fructofuranosidase gespalten und anschließend die Konzentration gebildeter Glucose bestimmt. Die enzymatische Spaltung erfolgte nach einer Methode von Bergmeyer (1970), und die Glucosebestimmung mit Hilfe eines Mercktestes 14365 Glucose[®] (Merck) über die sogenannte GOD-PAP-Methode (Kapitel 2.2.7.7).

Für die enzymatische Spaltung wurden:

200 µL Acetatpuffer (100 mL 1 M Essigsäure + 50 mL M Natronlauge,
ad 1000 mL, pH 4,6)

100 µL filtriertes Medium

20 µL Fructofuranosidase (750 U/mL in Acetatpuffer, pH 4,6)

für 15 min bei 25 °C inkubiert. Dieser Reaktionsansatz wurde zur Glucosebestimmung im Glucose-Test eingesetzt (Kapitel 2.2.7.7).

2.2.7.7 Glucosebestimmung

Die Konzentration der Glucose wurde mit dem Mercktest 14365 Glucose[®] über die GOD-PAP-Methode bestimmt. Glucoseoxidase (GOD) katalysiert die Oxidation von Glucose zu Gluconsäure. Das bei dieser Reaktion gebildete Wasserstoffperoxid reagiert in Gegenwart einer Peroxidase mit Aminoantipyrin und p-Hydroxybenzoesäure zu N-(4-antipyrill)-p-benzochinonimin. Die Extinktion dieses Farbstoffes wurde photometrisch bei 510 nm ermittelt. Der Extinktionskoeffizient hat bei 510 nm einen Wert von 6310 L/mol x cm, er wurde mittels einer Kalibrierreihe bestimmt.

Zur Durchführung des Testes wurden 300 µL Probelösung mit 3000 µL Testreagenz (siehe Angaben des Herstellers) versetzt und im Dunkeln bei Raumtemperatur 30 min inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion des gebildeten roten Farbkomplexes bei 510 nm photometrisch bestimmt.

2.2.7.8 Bestimmung des HCN-Potentials

Die transformierten Wurzeln und die Zellkulturen wurden auf den Gehalt von Blausäure freisetzenden Verbindungen untersucht. Zur Beurteilung dieser

Ergebnisse wurde das Potential an Blausäureverbindungen von einzelnen Organen einer Leinpflanze bestimmt.

Die Bestimmung des HCN-Potentials beruht auf der methanolischen Extraktion der cyanogenen Glycoside, ihrer anschließenden enzymatischen Hydrolyse und einer quantitativen Analyse des freigesetzten Cyanids.

2.2.7.8.1 Extraktion der cyanogenen Glycoside

Das gefriergetrocknete Probenmaterial wurde mit etwas Seesand und reinem Methanol (30 mL/g TG) im Mörser zerrieben, dieser wurde nach der Homogenisation zweimal mit Methanol gewaschen. Homogenat sowie Waschlösungen wurden vereinigt, im Ultraschallbad 3 Minuten extrahiert und anschließend 10 Minuten bei 16.000 x g zentrifugiert. Das erhaltene Sediment wurde weitere zweimal im Ultraschallbad mit je 10 mL Methanol pro g TG extrahiert. Die Überstände der Extraktionen wurden vereinigt und durch einen Spartanfilter (Porengröße 0,45 µm) filtriert. Durch die getrennte Untersuchung der Überstände aus einzelnen Extraktionsschritten, wurde nachgewiesen, daß die cyanogenen Glycoside durch die oben beschriebene Extraktion vollständig aus dem Pflanzenmaterial extrahiert wurden. Die methanolischen Extrakte wurden bei -20 °C bis zur enzymatischen Spaltung aufbewahrt.

2.2.7.8.2 Enzymatische Spaltung der cyanogen Glycoside

Enzyme

Um ein möglichst großes Spektrum an cyanogenen Glycosiden zu erfassen, wurde zur enzymatischen Spaltung der Blausäureverbindungen ein Enzymgemisch, bestehend aus einer β -Glucosidase von *Hevea brasiliensis* und aus Emulsin, eingesetzt.

Bei der β -Glucosidase aus *Hevea brasiliensis* handelte es sich um eine partiell gereinigte Enzymfraktion (Gelfiltration, G150). Dieses Enzym spaltet nur Monoglucoside wie Linamarin oder Lotaustralin, jedoch nicht die Diglucoside Linustatin und Neolinustatin (SELMAR et al., 1987).

Emulsin ist ein β -Glucosidasegemisch aus Mandeln, das sowohl aromatische Monoglucoside als auch aromatische und aliphatische Diglucoside hydolysiert (HÖSEL, 1981).

Das verwendete Enzymgemisch setzte sich zusammen aus 10 mg Emulsin (Firma Fluka) gelöst in 1 mL der partiell gereinigten β -Glucosidase. Das Enzymgemisch hatte eine Aktivität von 550 nkat/mL, die während der Lagerung bei -18°C über den Versuchszeitraum nur unwesentlich zurück ging.

Die Spaltung einer definierten Menge an Linamarin und Linustatin, die zehnfach über den Gehalten in den Proben lag, bestätigte, dass eine ausreichende Enzymaktivität eingesetzt worden ist.

Inkubation im Thunberg-Gefäß

Um während der Inkubation Verluste an freiwerdender Blausäure zu vermeiden, erfolgte der enzymatische Abbau im Thunberg-Gefäß. Die freiwerdende Blausäure konnte vollständig in der Natronlaugevorlage aufgefangen werden.

Der methanolische Extrakt wurde daher direkt im Thunberg-Gefäß im Luftstrom bis zur Trockne eingent. Diese wurde anschließend in 1 mL Mc Ilvaine Puffer pH 5,6 (200 mmol/L) resuspendiert und die Reaktion durch Zugabe von 100 μ L Enzymlösung gestartet. Die Inkubation erfolgte für mindestens 12 Stunden bei 30 °C. Nach der Inkubation wurde die Inkubationslösung mit der Natronlauge alkalisiert und die Reaktion dadurch abgestoppt. Die Alkalisierung gewährleistet, dass bei der Hydrolyse entstandenes Cyanhydrin vollständig zu Blausäure und dem entsprechenden Keton zerfällt. Die alkalisierte Inkubationslösung wurde direkt für den Cyanid-Test (siehe Kapitel 2.2.7.8.3) eingesetzt.

Inkubationsansatz im Warburg-Gefäß

In den konzentrierten methanolischen Extrakten der transformierten Wurzeln und der Zellkulturen lagen Substanzen vor, welche die Nachweisreaktion des Cyanid-Testes störten. Diese Beeinflussung konnte besonders bei sehr geringen HCN-Konzentrationen zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Für die Inkubationen der Wurzel- und Zellkulturextrakte wurden daher keine Thunberg-Gefäße sondern Warburg-Gefäße verwendet.

In diesen Inkubationsgefäßen wurden die enzymatisch hydrolysierten Proben nicht direkt für den Cyanid-Test eingesetzt, sondern die Blausäure wurde aus der Lösung ausgetrieben und in eine Natronlaugenvorlage überführt. Als Natronlaugenvorlage fungierte ein sich im Innenraum des Warburg-Gefäßes befindliches Rundgefäß. Der methanolische Extrakt wurde bis zur Trockne im

Luftstrom eingeeengt und anschließend mit Mc Ilvaine Puffer pH 5,6 (200 mmol/L) resuspendiert. Dieser wässrige Extrakt wurde in den äußeren Bereich des Waburg-Gefäßes gegeben, während im Mittelgefäß 0,5 mL Natronlauge (1 M) vorgelegt wurden. Durch Zugabe von 100 µl Enzymgemisch zu dem wässrigen Extrakt wurde die Inkubation gestartet. Nach der Inkubation (12 h, 30 °C) wurde das Inkubat durch Zugabe von 0,5 mL 1 molare Natronlauge alkalisiert um eine vollständige Spaltung der Cyanhydrine zu gewährleisten. Eine Stunde nach der Alkalisierung wurde in den äußeren Bereich des Gefäßes 1 mL Salzsäure (1M) zugesetzt. Die Ansäuerung führt dazu, dass das Cyanid sämtlich als Blausäure vorliegt, aus der Inkubationslösung entweicht und sich in der Natronlaugevorlage anreichert. Diese Nachinkubation erfolgte für 12 Stunden bei 30 °C. Für den Cyanid-Test (siehe Kapitel 2.2.7.8.3) wurde die vorgelegte Natronlauge eingesetzt.

2.2.7.8.3 Cyanidbestimmung

Für die Cyanidbestimmung wurde der Spektroquant[®] 14800 Cyanidtest der Firma Merck verwendet. Der Nachweis beruht auf einer Methode von Aldrige (1944). Das Cyanid reagiert zu Chlorcyan, das mit Pyridin zu Glutacondialdehyd weiterreagiert und mit 1,3-Dimethylbarbitursäure zu einem violetten Polymethin-farbstoff kondensiert. Der Farbstoff wurde photometrisch bei 585 nm quantifiziert. Der molare Extinktionskoeffizient wurde mittels einer Kalibrierreihe bestimmt und betrug 131600 L/mol x cm. Zur Durchführung des Testes wurden die alkalische Inkubationslösung bzw. Natronlauge mit der äquimolaren Menge Salzsäure neutralisiert und 500 µL verdünnter Mc Ilvaine-Puffer pH 7,0 (20 mmol/L) zugesetzt. Der Ansatz wurde mit destilliertem Wasser auf 5,0 mL aufgefüllt und die Testreagenzien nach Herstellerangaben zugegeben.

2.2.7.9 Analyse der cyanogenen Glycoside in Zellkulturen von *Linum usitatissimum*

2.2.7.9.1 Methanolische Extraktion

Das gefriergetrocknete Probenmaterial wurde wie in Kapitel 2.2.7.8.1 beschrieben mit etwas Seesand und reinem Methanol im Mörser zerrieben und im Ultraschallbad extrahiert. Anders als in diesem Kapitel beschrieben wurde als

interner Standard zu Beginn der Homogenisation 50 µL Phenyl-β-D-glucopyranosid-Lösung (1mg/mL in Methanol) zugesetzt. Die methanolischen Extrakte wurden bei -20 °C bis zur Derivatisierung aufbewahrt.

2.2.7.9.2 Gaschromatographie

Die Analyse cyanogener Glycoside der Zellkultur von *Linum usitatissimum* im Verlauf einer Wachstumskurve erfolgte über eine gaschromatographische Trennung ihrer Silylderivate. Eine Bestimmung der Zusammensetzung des Blausäurepotential der Wurzelflüssigkulturen wurde ebenfalls mit dieser Methode durchgeführt.

Derivatisierung der Proben

Für die Derivatisierung wurden die methanolischen Extrakte mittels Vakuumzentrifuge mit Kühlfalle bis zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wurde in 20 µL wasserfreiem Pyridin aufgenommen und anschließend mit 50 µL Trimethylchlorsilan (TCMS) und 50 µL N,N-bis-Trimethylsilyltrifluoracetamid (BSTFA) versetzt. Die Proben wurden 12 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Dadurch wurde eine vollständige Überführung aller Hydroxylgruppen der Glycoside in ihre entsprechenden Silylester gewährleistet.

Trennbedingungen

| | |
|---------------------|--|
| Säule: | DB5 |
| Innerdurchmesser: | 0,32 mm |
| Schichtdicke: | 0,25 µm |
| Länge: | 30 m |
| Mobile Phase: | Helium |
| Injektor: | on colum (Raumtemperatur) |
| Probenvolumen: | 0,5-1 µL |
| Detektor: | FID (340 °C) |
| Brenngase: | Wasserstoff / synthetische Luft |
| Temperaturprogramm: | 175 °C - 280 °C mit 20 °C/min 280 °C - 310 °C mit 15 °C/min 310 °C - 320 °C mit 5 °C/min 320 °C für 2 min |

Identifikation der cyanogenen Glucoside

Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit Hilfe der Baseline-810-Software (Dynamic SolutionsTM, Division of Millipore). Die cyanogenen Glucoside in den Extrakten wurden sowohl über Co-Chromatographie, als auch über den Vergleich der Retentionszeit mit Standards der Reinsubstanzen identifiziert. Für Lotaustralin stand keine ausreichende Menge eines definierten Standards zur Verfügung.

Quantifizierung der cyanogenen Glucoside

Die Bestimmung der Gehalte cyanogener Glucoside in den Proben erfolgte durch Integration der entsprechenden Peakflächen. Dabei wurde die Fläche der einzelnen Substanzpeaks stets auf die des internen Standards Phenylglucosid bezogen.

$$\text{Relative Peakfläche} = \text{Peakfläche (Substanz)} / \text{Peakfläche (Interner Standard)}.$$

Die Proportionalität der Flächen zu den eingesetzten Substanzmengen wurde durch eine Kalibriergerade mit Proben definierter Gehalte an cyanogenen Glucosiden überprüft.

2.2.8 Enzymatische Untersuchungen

2.2.8.1 Probenvorbereitung

2.2.8.1.1 Zellen und Wurzeln

Die Zellen und die Wurzeln der Suspensions- bzw. Flüssigkulturen wurden durch ein Nylontuch filtriert und so vom Medium abgetrennt. Nach der Bestimmung des Frischgewichtes wurde das Zellmaterial unmittelbar für die Enzympräparation eingesetzt oder bei -70°C gelagert.

2.2.8.1.2 Kulturmedium

Um aus dem Kulturmedium noch einzelne Zellen oder Zelltrümmer zu entfernen, wurde das Medium 30 Minuten mit 15.000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde es für die Aktivitätsbestimmungen mit Hilfe von Konzentratoren

(Centriprep 3, Trenngrenze 3.000 D, Amicon) auf ein Zehntel bis Zwanzigstel des ursprünglichen Volumens eingeeengt.

Jeder Konzentrator besteht aus einem Probenbehälter für Probe und Konzentrat, sowie einem inneren Filtratkollektor für das Filtrat, ausgestattet mit einem Ultrafilter. Durch hydrostatischen Druck, verursacht durch die Zentrifugation, werden Lösungsmittel und gelöste Stoffe niedriger Molmasse durch den Ultrafilter in den Filtratkollektor gedrückt. Stoffe mit einer Molmasse oberhalb der gewählten Trenngrenze werden zurückgehalten und im äußeren Probenbehälter konzentriert.

Die eingeeengten Proteinlösungen wurden über eine kleine Gelfiltrationssäule (Columns PD-10[®] mit Sephadex G-25, Pharmacia) von Substanzen mit geringem Molekulargewicht getrennt. Auf die mit dem entsprechenden Puffer äquilibrierte Säule wurden 2,5 mL des konzentrierten Kulturmediums appliziert, das anschließend mit 3,5 mL Probenpuffer eluiert wurde.

Alle Arbeitsschritte zum Aufkonzentrieren und Reinigen des Mediums erfolgten bei 4°C.

2.2.8.1.3 Protoplastenpräparation aus Zellsuspensionskultur

Isolationsmedium

Das Isolationsmedium wurde in Anlehnung an eine Methode von Henges (1999) hergestellt. Dabei wurde das Kulturmedium der Zellen so verändert, das es zur Isolation und Stabillisierung der Protoplasten geeignet ist. So wurde der Gehalt an Calcium durch Zugabe der 1,4 fachen Menge CaCl_2 erhöht, da dies die Stabilität der Protoplastenmembran vergrößert.

Das Osmotikum des Mediums wurde dem osmotischen Wert der Zellen angepaßt und setzte sich damit folgendermaßen zusammen:

Zusammensetzung des Isolationsmediums:

| | |
|--------------------|---|
| Makronährelemente: | siehe Tabelle 1, Calciumkonzentration wurde auf 4,8 mmol/L (0,5 g/L CaCl_2) verändert |
| Mikronährelemente: | siehe Tabelle 1 |
| Vitamine: | siehe Tabelle 1 |

| | |
|-------------|-----------------|
| Glycin: | siehe Tabelle 1 |
| Saccharose: | 15,00 g/L |
| Mannitol: | 45,55 g/L |
| Sorbitol: | 45,55 g/L |

Das Medium wurde mit 0,1 molarer KOH auf pH 5,7 eingestellt und anschließend autoklaviert. Das Medium konnte bei 4°C mehrere Wochen gelagert werden. Zur eigentlichen Isolation der Protoplasten wurde das Isolationsmedium mit den lytischen Enzymen Cellulase Onkozuka R-10 aus *Trichoderma viride* (0,25 g/L, Seva) und Mazerozym R-10 aus *Rhizopus sp.* (0,25 g/L, Merck) versetzt.

Protoplastenpräparation

Zur Isolation von Protoplasten wurden stets Zellen eingesetzt, die sich am Anfang der exponentiellen Wachstumsphase befanden (5 Tage nach einer Subkultivierung).

Die Zellen dieses Wachstumsstadiums haben noch keine größeren Zellaggregate gebildet und liegen überwiegend als Einzelzellen vor; sie stellen somit gut geeignetes Ausgangsmaterial dar.

Vor dem Überführen der Zellen in das Isolationsmedium wurden die Zellen durch ein Nylonnetz (Porengröße 60 µm) abfiltriert. Das restliche Medium wurde mit Cellulosepapier abgetrocknet. Für die Isolation wurden 1g Zellen mit 10 mL Isolationsmedium in einem 100 mL Erlenmeyerkolben bei 100 rpm geschüttelt. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln bei 26 °C für 4 Stunden.

Konzentration und Reinigung

Um die Zellen von größeren Zellaggregaten, Zellwandfrakmenten und den lytischen Enzymen zu trennen, wurde das erhaltene Inkubat durch ein Nylonnetz filtriert und anschließend bei 100 x g und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Sediment mit enzymfreiem Isolationsmedium gewaschen. Die sedimentierten Protoplasten wurden in Isolationsmedium resuspendiert und über einen Ficoll-Dichtegradienten (1, 10, 15 % w/v Ficoll im Isolationsmedium) bei 100 x g und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Die an den Phasengrenzen befindlichen Protoplasten wurden auf ihre Intaktheit geprüft (Vitalitätstest, Kapitel 2.2.6.2) und anschließend noch

einmal über den obigen Stufengradienten aufgereinigt. Abschließend wurden die Protoplasten auf einem Kissen von 15 % Ficoll sedimentiert. Die Zentrifugationen erfolgten bei 100 x g im gekühlten Ausschwingrotor für jeweils 45 Minuten.

Für jede Protoplastenfraktion wurden parallel 4 Isolationsansätze mit je 1 g Zellen aus dem selben Kulturkolben durchgeführt, die nach der Reinigung vereinigt wurden.

Alle Arbeitsschritte zur Protoplastenisolation erfolgten unter sterilen Bedingungen.

2.2.8.1.4 Pflanzenorgane

Die Pflanzen wurden in die einzelnen Organe zerlegt. Diese wurden anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Aufarbeitung bei -70 °C gelagert.

2.2.8.2 Linamarase

Die Linamarase in Leinpflanzen ist eine β -Glucosidase, die neben Linamarin auch weitere Glucoside hydolysiert, jedoch keine Diglucoside spaltet.

Enzympräparation

Das gefrorene Pflanzen- bzw. Zellkultur- und Wurzelkulturmaterial wurde unter Zugabe von flüssigem Stickstoff fein zermörsert. Anschließend wurde das Probenmaterial mit dem vierfachen Volumen an hypotonischem Puffer gemischt (Citrat/Phosphat, 40 mmol/L, pH 5,6; 2 mmol/L Na-Ascorbat) und dreimal 30 Sekunden mit einem Ultra Turrax homogenisiert. Das Homogenat wurde durch ein Nylontuch gepreßt und das Filtrat für eine Stunde bei 30.000 x g zentrifugiert. Der resultierende Überstand, der als Niedersalzextrakt bezeichnet wird, wurde über eine kleine Gelfiltrationssäule nach Herstellerangaben (Columns PD 10[®] mit Sephadex G-25, Pharmacia) von Substanzen mit geringerem Molekulargewicht getrennt und anschließend für die Aktivitätstests verwendet.

Der unlösliche Homogenisationsrückstand wurde mehrfach nachextrahiert und erneut im vierfachen Volumen Extraktionspuffer aufgenommen und resuspendiert. Anschließend wurde wie oben beschrieben abfiltriert. Der Zellwandrückstand wurde auf diese Weise viermal gewaschen. Der mehrfach gewaschene Rückstand wurde ebenfalls im vierfachen Volumen Extraktionspuffer, dem 1,2 mol/L NaCl zugesetzt wurde, resuspendiert und eine Stunde bei 4 °C belassen.

Dieser Hochsalzextrakt wurde erneut durch das Nylontuch gepresst. Das Filtrat wurde bei 30.000 x g eine Stunde zentrifugiert und der Überstand, nach Reinigung über eine Gelfiltrationsäule (Columns PD 10[®], siehe oben), für die Aktivitätsbestimmungen eingesetzt. Alle Arbeitsschritte zur Herstellung der Enzymextrakte wurden bei 4 °C durchgeführt.

Aktivitätsbestimmung

Die Linamarse spaltet das cyanogenen Monoglucosid Linamarin in Glucose und das α -Hydroxynitril (Aceton). Wird der Enzymansatz nach beendeter Inkubation alkalisch abgestoppt, zerfallen die gebildeten α -Hydroxynitrile in die Carbonylverbindung und Blausäure. Die Aktivitätsbestimmung der Linamarase erfolgte über die Messung der Konzentrationsänderung an Cyanid pro Zeiteinheit. Dazu wurde die Enzymprobe wie folgt im Thunberg-Gefäß mit Linamarin inkubiert:

200 μ L Enzymlösung

200 μ L Linamarinlösung (10 mmol/L in Mc Ilvaine-Puffer pH 5,6)

Inkubationsbedingungen: 1h bei 30 °C.

Nach erfolgter Inkubation wurde die Inkubationslösung mit 200 μ L 1 M Natronlauge alkalisiert und die Reaktion abgestoppt. Das entstandene Cyanhydrin zerfällt im alkalischen Milieu des abgestoppten Reaktionsansatzes im Verhältnis 1:1 zu Blausäure und Aceton. Als Produktkonzentration wurde mit Hilfe eines Spektroquant[®] 14800 Cyanidtest der Firma Merck die Blausäurekonzentration bestimmt (siehe Kapitel 2.2.7.8.3).

2.2.8.3 Linustatinase

Die in Samen von *Linum usitatissimum* nachgewiesene und gereinigte Linustatinase (FAN und CONN, 1985) ist eine β -Glucosidase, die spezifisch 1,6 und 1,3-Bindungen hydrolysiert und damit den sequentiellen Abbau von Linustatin einleitet. Im Fall einer sequentiellen Hydrolyse spaltet sie vom cyanogenen Substrat Linustatin die terminale Glucose hydrolytisch ab, so dass als Produkt neben Glucose Linamarin entsteht.

Enzympräparation

Die Aufarbeitung des Probenmaterials für die Bestimmung der Linustatinase erfolgte in gleicher Weise wie in Kapitel 2.2.8.2 für die Linamarase beschrieben.

Aktivitätsbestimmung

Die untersuchte Linustatinase spaltet vom cyanogenen Substrat Linustatin die terminale Glucose hydrolytisch ab, so dass als Produkt neben Glucose Linamarin entsteht. Die Aktivitätsbestimmung der enzymatisch katalysierten Reaktion kann über die gebildete Produktkonzentration pro Zeiteinheit erfolgen. Als Produktkonzentration kann sowohl die Linamarin- als auch die Glucosemenge erfaßt werden. Da für die Glucosebestimmung ein einfacher Test zur Verfügung stand (siehe Kapitel 2.2.7.7), wurde die Glucosekonzentration ermittelt. Da die eingesetzte Enzymlösung große Mengen an Linamarin spaltender Linamarase enthält, wurde auch das entsprechende Monoglucosid Linamarin weiter zu Acetoncyanhydrin und Glucose gespalten. Demnach wird bei der sequentiellen Spaltung von Linustatin neben der terminalen Glucose auch die primäre Glucose und das Acetoncyanhydrin frei, das im Alkalischen Milieu des abgestoppten Reaktionsansatz quantitativ im Verhältnis 1:1 zu Blausäure und Aceton zerfällt. Die gesamte Glucosekonzentration setzt sich additiv aus der Konzentration der terminalen und Anteilen der primären Glucose zusammen. Da die Cyanidkonzentration äquimolar der primären Glucosekonzentration ist, kann die Konzentration an terminaler Glucose aus der Differenz zwischen gesamter Glucosekonzentration und der Cyanidkonzentration berechnet werden.

$$[\text{Glucose}_{\text{Linustatinase}}] = [\text{Glucose}_{\text{gesamt}}] - [\text{HCN}]$$

Zur Messung des Umsatzes von Linustatin durch die Linustatinase wurde die freigesetzte Glucose- und Cyanidmenge bestimmt.

Die Linustatinaseprobe wurde dazu folgendermaßen im Thunberg-Gefäß mit Linustatin inkubiert:

200µL Enzymlösung

200µL Linustatinlösung (10 mmol/L in Mc Ilvaine-Puffer pH 5,6)

Inkubationsbedingungen: 1 h bei 30 °C.

Nach erfolgter Inkubation wurde auch diese Inkubationslösung mit 200 μ L Natronlauge alkalisiert und die Reaktion abgestoppt. Auch bei dieser Reaktion zerfällt das entstandene Cyanhydrin im alkalischen Milieu des abgestoppten Reaktionsansatzes im Verhältnis 1:1 zu Blausäure und Aceton. Die Blausäurekonzentration wurde mit Hilfe eines Spektroquant[®] 14800 Cyanidtest der Firma Merck (Kapitel 2.2.7.8.3) und die Glucosemenge durch einen Mercktest 14365 Glucose[®] über die GOD-PAP-Methode (Kapitel 2.2.7.7) bestimmt.

2.2.8.4 β -Cyanoalaninsynthase

Das Enzym β -Cyanoalaninsynthase (β -Cas, EC 4.4.1.9) bindet freie Blausäure an Serin oder Cystein. Das entstehende β -Cyanolanin kann von einer β -Cyanoalaninhydrolase zu Aparagin umgebaut werden, das in den allgemeinen Aminosäurepool eingeht (CASTRIC et al., 1972).

Enzympräparation

Das Zellmaterial und die transformierten Wurzeln der Flüssigkulturen sowie die Pflanzenorgane wurden im eisgekühlten Mörser mit flüssigen Stickstoff fein zerrieben. Das gefrorene Probenpulver wurde mit dem vierfachen Volumen eines 0,2 M Tris/HCl-Puffer pH 8,2 (2 mM Ascorbinsäure) versetzt und mit einem Ultra-Turrax homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat 60 Minuten bei 30.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Sediment erneut mit 3 mL Puffer gewaschen. Die Überstände der Zentrifugationen wurden vereinigt und für den Aktivitätstest eingesetzt, ebenso das abfiltrierte und eingeeengte Kulturmedium

Alle Arbeitsschritte zur Herstellung der Enzymextrakte erfolgten bei 4 °C.

Aktivitätsbestimmung

Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte nach dem Verfahren von Blumenthal et al. (1963). Der bei der Bildung von β -Cyanoalanin aus Cystein und Cyanid entstehende Schwefelwasserstoff reagiert dabei in Anwesenheit von Eisen(III) - Ionen mit N,N-Dimethylphenylendiamin zu Methylenblau (H_2S -Nachweis nach SIEGEL, 1965).

Dieser Test wurde wegen seiner Toxizität um 60 % gegenüber den Literaturangaben verkleinert und in Eppendorf-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

0,2 mL Cysteinlösung (10 mM in Tris/HCl pH 8,2)

0,2 mL Kaliumcyanidlösung (300 mM in Tris/HCl pH 8,2)

0,4 mL enzymhaltige Probe.

Inkubationsbedingungen: 30 min bei 30 °C

Gestoppt wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,4 mL eines Gemisches aus:

0,2 mL FeCl_3 (30 mM in 1,2 M HCl)

0,2 mL N,N-Dimethylphenylendiamin (20 mM in 7,2 M HCl).

Der Ansatz wurde 20 Minuten bei 30 °C nachinkubiert. Um ausgefallenes Protein zu sedimentieren, wurde anschließend 10 min bei 16.000 x g zentrifugiert. Das gebildete Methylenblau wurde bei 650 nm photometrisch quantifiziert.

Als Blindwert wurde für jede Probe eine Reaktion sofort nach Zugabe des Homogenates abgestoppt und gemessen.

Die Auswertung erfolgte über eine Kalibriergerade für Methylenblau, die im Bereich zwischen 2,5 nmol bis 50 nmol pro Ansatz linear verläuft. Es wurde ein molarer Extinktionskoeffizient von $\varepsilon = 55.500 \text{ L/mol} \times \text{cm}$ ermittelt.

2.2.8.5 Rhodanase

Rhodanase (EC 2.8.1.1) ist eine Thiosulfat-Cyanid-Schwefel-Transferase, welche die Fixierung von Cyanid an Sufanschwefel katalysiert.

Neben der β -Cyanoalinsynthase ist die Rhodanase das zweite Enzym, das in Pflanzen zur Fixierung von Blausäure beschrieben wurde.

Enzympräparation

Das Zellmaterial und die transformierten Wurzeln der Suspensions- und Flüssigkulturen sowie die Pflanzenorgane wurden im vorgekühlten Mörser mit flüssigem Stickstoff fein zerrieben und anschließend mit der vierfachen Menge (w/v) eines verdünnten Natriumphosphatpuffers (20 mmol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH 8,2) versetzt. Der Zellbrei wurde mit dem Ultra-Turrax aufgeschlossen und anschließend 60 Minuten bei 30.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde

abgenommen und das Sediment erneut mit 3 mL Puffer extrahiert. Die Überstände der Zentrifugationen wurden vereinigt und für den Aktivitätstest eingesetzt.

Das abfiltrierte Kulturmedium wurde wie in Kapitel 2.2.8.1.2 beschrieben eingengt und ebenfalls für die Bestimmung der Enzymaktivität eingesetzt.

Alle Arbeitsschritte zur Herstellung des Enzymextraktes erfolgten bei 4 °C.

Aktivitätsbestimmung

Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte nach der Methode von Sörbo (1953), modifiziert nach Chew (1973). Der Test beruht auf der Bildung von Thiocyanat (SCN^-) aus Thiosulfat und Cyanid. Thiocyanat bildet mit Eisennitrat einen farbigen Komplex, dessen Konzentration photometrisch bestimmt werden kann. Für das entsprechende Testreagenz werden 100 g Eisennitrat ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \times 9 \text{ H}_2\text{O}$) und 200 mL Salpetersäure (HNO_3 , 65 %) mit Wasser auf 1 L aufgefüllt.

Thiocyanat entsteht in pflanzlichen Homogenaten auch spontan oder auf dem Wege der nicht-enzymatischen Katalyse etwa durch Metallionen und Thiole.

Ein Blindwert, der diese Reaktionen erfaßt, ist daher für die Bestimmung der eigentlichen Enzymaktivität besonders wichtig (LIEBEREI & SELMAR, 1990).

Aufgrund der im Test als Substrat eingesetzten Blausäure wurde der Reaktionsansatz gegenüber den Literaturangaben um den Faktor 2,5 verkleinert und die Inkubation in gut verschließbaren Eppendorf-Reaktionsgefäßen durchgeführt.

Der Ansatz enthielt:

0,2 mL enzymhaltige Probe

0,4 mL $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (125 mM in 0,2 M Natriumphosphat-Puffer, pH 8,2)

0,4 mL KCN (200 mM in 0,2 M Natriumphosphat-Puffer, pH 8,2).

Inkubationsbedingungen: 90 min bei 30 °C

Nach erfolgter Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe folgender Reagenzien gestoppt:

0,2 mL Formaldehyd (37 %)

1,0 mL $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ -Reagenz

Anschließend wurde 5 min bei 16.000 x g zentrifugiert und die Extinktion des Überstandes bei 460 nm bestimmt ($\varepsilon = 4.490 \text{ L/mol} \times \text{cm}$).

Die Auswertung erfolgte nach Lieberei und Selmar (1990). Neben der Extinktion des Ansatzes mit frischem Enzympräparat (A_1) wurden auch die Extinktionen verschiedener Blindwerte bestimmt. Ein Ansatz enthielt abgekochte Enzymlösung zur Erfassung der spontanen nicht-enzymatischen katalysierten SCN^- -Bildung (A_2). In zwei weiteren Ansätzen mit frischem (B_1) und abgekochten (B_2) Enzym wurde diese Reaktion noch vor der Zugabe durch Formaldehyd blockiert. Die tatsächliche enzymatische durch eine Rhodanase bedingte Extinktion (R) errechnet sich wie folgt:

$$R = A_1 - A_2 + B_2 - B_1$$

2.2.8.6 NADH:Malatdehydrogenase

Die NADH:Malatdehydrogenase (EC 1.1.1.37) katalysiert die Oxidation von Malat zu Oxalacetat, dabei wird das Cosubstrat NAD^+ reduziert. Diese Reduktion des Cosubstrates dient der Aktivitätsbestimmung des Enzyms, das nahezu in allen Kompartimenten der Zelle vorkommt.

Enzympräparation

Das Zellmaterial und die transformierten Wurzeln der Suspensions- und Flüssigkulturen sowie die Pflanzenorgane wurden im eisgekühlten Mörser zu einem feinen Pflanzenpulver zerrieben. Anschließend wurde dieses Pulver in dem vierfachen Volumen eines Natriumphosphat-Puffers (10 mM, pH 6,8) suspendiert und mit Hilfe von zugesetzten Glasperlen extrahiert. Unlösliche Bestandteile, wie Zellwandbruchstücke und Membranen, wurden bei 30.000 x g für 1 Stunde in der Zentrifuge sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Sediment noch zweimal gewaschen. Die vereinigten Überstände wurden wie das Kulturmedium für die Aktivitätsbestimmung der Malatdehydrogenase eingesetzt. Alle Arbeitsschritte zur Enzympräparation wurden bei 4 °C durchgeführt.

Aktivitätsbestimmung

Die Aktivitätsbestimmung der NADH:Malatdehydrogenase wurde nach einer Vorschrift von Bergmeyer (1970) durchgeführt. Bei dieser Methode wurde die Oxidation des Cosubstrates NADH_2^+ photometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm verfolgt.

Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

2,5 mL Tris/HCl-Puffer (50 mmol/L, pH 7,8)

0,1 mL NADH_2^+ (2 mg/mL)

0,2 mL enzymhaltige Probe.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,2 mL der Oxalessigsäure (1 mg/mL) gestartet, die anderen Komponenten wurden gut verrührt und 30 Sekunden vorinkubiert. Die Messung erfolgte kontinuierlich am Photometer mit angeschlossenem Schreiber bei 340 nm. Es wurde ein molarer Extinktionskoeffizient von $\varepsilon = 6300 \text{ L/mol} \times \text{cm}$ ermittelt.

2.2.9 Versuche zur Aufnahme von cyanogenen Glycosiden in Zell- und Wurzelkulturen von *Linum usitatissimum*

Zur Untersuchung der Aufnahme von cyanogenen Glycosiden in die Zellen der Zell- und Wurzelkulturen wurden die Suspensionen und Flüssigkulturen unter Standardbedingungen 6 bzw. 8 Tage kultiviert. Anschließend wurden sie in neues Medium transferiert und das Medium mit Linustatin versetzt.

2.2.9.1 Inkubation der Zell- und Wurzelkulturen mit Linustatin

Die Inkubation erfolgte in 50 mL Erlenmeyerkolben, die zusätzlich mit einem kleinen Gefäß im Innenraum ausgestattet waren. In die kleinen Gefäße wurde 0,5 mL einer 1 molaren Natronlauge gefüllt. Diese Gefäße dienten als Auffanggefäß für im Medium freigewordene Blausäure, die in die Gasphase entwich, und als Cyanid im alkalischen Milieu der Natronlauge zurückgehalten wurde (Cyanid-Falle).

Sech bzw. acht Tage alte Zellen und Wurzeln wurden durch ein Sieb filtriert und mit einem Stück Zellstoff wurde das restliche Medium abgesaugt. Anschließend wurde eine definierte Menge Probenmaterial abgewogen und mit frischem

Medium in die vorbereiteten Erlenmeyerkolben gegeben. Das Linustatin wurde als Stammlösung (10 mmol/L, in Medium) mit einer Endkonzentration von 200 µmol/L zugesetzt. Die Kolben wurden mit Parafilm verschlossen und für 24 Stunden bei 26 °C auf dem Kreisschüttler inkubiert.

2.2.9.1.1 Inkubation mit Linustatin bei unterschiedlichen pH-Werten

Der Standardinkubationsansatz wurde zur Ermittlung der pH-Wert-Abhängigkeit der Linustatinaufnahme in Zell- und Wurzellkulturen modifiziert. Dazu wurde das Medium im physiologischen pH-Bereich auf Werte zwischen 4,5 und 7,0 eingestellt und wie im Standardinkubationsansatz eingesetzt.

2.2.9.1.2 Inkubation mit unterschiedlichen Linustatinkonzentrationen

Zur Ermittlung der Konzentrationsabhängigkeit der Linustatinaufnahme in die Zell- und Wurzellkulturen wurde der Standardinkubationsansatz modifiziert. Dazu wurde die Konzentration des Linustatins durch Zugabe unterschiedlicher Volumina der Stammlösung variiert. Das fehlende Volumen wurde durch Medium ausgeglichen. Eingesetzt wurden Konzentrationen von 10-500 µmol/L.

2.2.9.1.3 Inkubation mit Linustatin und weiteren cyanogenen Glycosiden

Amygdalin, Prunasin oder p-Nitrophenylglucopyranosid (p-NPG) wurde zur Ermittlung des Einflusses von anderen Glycosiden auf die Aufnahme von Linustatin in die Zell- und Wurzellkulturen in einzelnen Inkubationsansätzen zugegeben. Die Konzentration der Glycoside betrug 200 µmol/L.

2.2.9.2 Probennahme und Probenvorbereitung

Nachdem die Inkubation abgeschlossen war, wurden die Zellen und Wurzeln unter Vakuum abfiltriert und sowohl Zell- bzw. Gewebematerial als auch Medium in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Natronlaugenvorlage wurde dem Gefäß entnommen und für die Cyanidbestimmung mit 1 mL 1M Salzsäure neutralisiert. Der Gehalt an freigesetzter Blausäure wurde umgehend als Cyanidkonzentration in der Lauge mit Hilfe des Spektroquant® 14800 Cyanid-Tests bestimmt.

Die gefrorenen Proben wurden gefriergetrocknet und wie in Kapitel 2.2.7.8.1 beschrieben methanolisch extrahiert. Der methanolische Extrakt wurde über die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) aufgetrennt und quantifiziert.

2.2.9.3 Analyse des aufgenommenen Linustatins über Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Zur Probenvorbereitung wurden die methanolischen Extrakte im Evaporator bis zur Trockne eingeeengt und der glycosidhaltige Rückstand in 75 µL Fließmittel aufgenommen. Um alle unlöslichen Bestandteile zu entfernen, wurden die Proben auf Microfilter (Spartan, 3/20, 0,45 µm Ø 3 mm, Schleicher & Schüll) gegeben und durch Zentrifugation (5 min 4.000 x g) filtriert. Die Filter wurde mit 25 µL HPLC-Laufmittel gewaschen und die einzelnen Filtrate wurden vereinigt. Diese Filtrate wurden über HPLC in die einzelnen Bestandteile fraktioniert und mittels Brechungsindexdetektor analysiert. Folgendes System wurde dazu verwendet:

Säulenkörper: Länge 25 cm, Durchmesser 0,4 cm, mit Vorsäule

Säulenmaterial: RP-18 (Macherey und Nagel), Partikelgröße 5 µm

Laufmittel: 7 % Methanol

Fluß: 1mL/min

Detektor: Brechungsindex und Durchflußszintillationszähler.

Die Retentionszeit von Linamarin beträgt 6,5 min und die von Linustatin 8,3 min.

Die Säule wurde nach jeder Probe mit 200 µL Methanol gewaschen.

3 Ergebnisse

Der Stoffwechsel cyanogener Glucoside ist an unterschiedlichen Pflanzen untersucht worden, dabei haben sich die meisten Arbeiten auf *Sorgum bicolor* (CONN, MØLLER), *Prunus serotina* (MØLLER), *Linum usitatissimum* (SELMAR) und *Hevea brasiliensis* (SELMAR) konzentriert. Besonders die Arbeiten am Kautschukbaum (*Hevea brasiliensis*) haben zur Aufklärung der Verlagerung cyanogenen Glucoside, wie Linamarin und Linustatin, beigetragen.

Ungeklärt blieben jedoch Fragen zur Aufnahme der cyanogenen Mono- und Diglucoside in die Zelle und zur Glucosylierung von Linamarin zu Linustatin durch ein entsprechendes Enzym.

Diese Arbeit beschäftigt sich sowohl mit der Erfassung einer Linamarin:Glucosyltransferase als auch mit der Aufnahme von cyanogenen Glucosiden in die Zellen. Die Untersuchung der Aufnahme erfolgte an Zell- und Gewebekulturen von *Linum usitatissimum*.

Zu Beginn dieser Arbeit war in *Linum usitatissimum* eine Glucosyltransferase, die Glucose auf Linamarin überträgt und damit Linustatin synthetisiert noch nicht nachgewiesen. Selmar (1992) beschrieb die Applikation von radioaktiv markiertem Valin, der biogenetischen Vorstufe des Linamarins (CUTLER & CONN, 1981), in den reifen Samen knospendender Leinpflanzen. Bei diesem Versuch war Linustatin mit der gleichen spezifischen Radioaktivität nachgewiesen worden wie die Aktivität des aus Blättern isolierten Linamarins. Dies war ein erster Hinweis, dass das deutlich später gebildete Linustatin aus dem Linamarin gebildet wurde und nicht *de novo* in den Samen synthetisiert wurde. Die nachfolgenden Untersuchungen an *Linum usitatissimum* sollten die Frage nach dem Vorkommen der Glycosyltransferase eindeutig klären.

Sagasser (1996) beobachtete die Entwicklung von Leinsamen und bestimmte parallel den Gehalt sowie das Spektrum der cyanogenen Glucoside in diesen Samen. Mit Hilfe dieser Daten war es möglich geeignetes Pflanzenmaterial für die Bestimmung der Glycosyltransferase auszugewählen. In der vorliegenden Arbeit wurde das Enzym durch eine Inkubation der Samen mit radioaktiv markierter [U]¹⁴C Fruktose-1,6-bisphosphat und anschließender Lokalisation der radioaktiven Markierung im gebildeten Linustatin nachgewiesen.

Die Untersuchungen zur Aufnahme von cyanogenen Glucosiden erfolgte an Zellsuspensionskulturen, die im Rahmen dieser Arbeit etabliert wurden. Dazu wurde Kallus aus Sprossabschnitten steriler Leinpflanzen induziert, der im Anschluss zur Herstellung einer Zellsuspensionskultur diente. Für Aufnahmeversuche an Gewebekulturen standen transformierte Wurzelkulturen zur Verfügung, die in Flüssigkultur übertragen wurden.

Als Erstes wurde das Wachstum dieser beiden Flüssigkulturen durch die Erfassung verschiedener Wachstumsparameter im Verlauf eines Wachstumszyklus charakterisiert. Weiterhin wurde der Gehalt und das Spektrum von cyanogenen Glucosiden in den Flüssigkulturen bestimmt. Diese Daten wurden mit Gehalten von Cyanglucosiden in verschiedenen Organen von Leinpflanzen verglichen und bewertet.

Ferner wurden die Zell- und Gewebekulturen daraufhin untersucht, ob sie einige der am Cyanidstoffwechsel beteiligten Enzyme enthalten. So wurde die Aktivität der Linamarin und Linustatin hydrolysierenden β -Glucosidasen bestimmt und das Vorkommen einer Rhodanase oder einer β -Cyanoalaninsynthase untersucht. Die beiden letzt genannten Enzyme sind in Pflanzen als Enzyme zur Fixierung von Cyanidstickstoff beschrieben.

Bei der Untersuchung der Linamarase und Linustatinase wurde jeweils auch die zelluläre Lokalisation dieser Enzyme analysiert. Um Aussagen über die Lokalisation der Linamarase und Linustatinase in den Zellkulturen machen zu können wurden daher das Kulturmedium und präparierte Protoplasten auf die Aktivität dieser Enzyme getestet.

Auf der Basis dieser Ergebnisse wurden Zell- und Wurzelkulturen mit Linustatin inkubiert. Eine chromatographische Analyse der methanolischen Extrakte der Kulturen und ihrer Medien gaben Aufschluss über eine Aufnahme cyanogener Glucoside. Dabei wurden der Einfluss der Konzentration des applizierten Cyanglucosides und der pH-Wert des Medium bestimmt, so wie die Wirkung weiterer Glucoside als Co-Substrate untersucht.

3.1 Nachweis der Glycosylierung von Linamarin

3.1.1 Pflanzenmaterial

Für den Nachweis des Enzyms war es zunächst notwendig das geeignetste Pflanzenmaterial zu wählen. Die Verlagerungs- und Metabolisierungs-Vorgänge

der cyanogenen Glycoside in *Linum usitatissimum* finden besonders in sich entwickelnden Geweben (z.B. beim Blattaustrieb oder bei der Samenentwicklung) statt (FREHNER et al., 1990). Da zudem in Leinsamen große Mengen des cyanogenen Diglucosides Linustatin akkumuliert werden (SMITH et al, 1980; SCHILCHER und WILKENS-SAUTER, 1986), wurde in dieser Arbeit die Glycosylierung von Linamarin in sich entwickelnden Leinsamen untersucht.

3.1.1.1 Samenentwicklung

Um für die Untersuchung der Glycosylierung von Linamarin zu Linustatin ein geeignetes Ausgangsmaterial mit möglichst hoher Enzymaktivität zu wählen, wurden die Untersuchungen von Sagasser (1996) herangezogen. Er bestimmte den Gehalt cyanogener Glycoside während der Samenentwicklung und verfolgte die begleitenden morphologischen Veränderungen.

Auf Grund der Änderungen von Frisch- und Trockengewicht und der morphologischen Erscheinung teilte Sagasser (1996) die Entwicklung des Leinsamens in vier Abschnitte ein: Zunächst wächst der Same zu seiner endgültigen Länge heran und anschließend beginnt die Größenzunahme des Embryos. Sobald dieser ausgewachsen ist, setzt in den Kotyledonen der Chlorophyllabbau ein und schließlich trocknet der Same aus.

Die Phase des Längenwachstums erstreckte sich bei der Varietät „Arion“ etwa bis zum 12. Tag nach der Bestäubung. Bis zum fünften Tag waren Endosperm und Embryo mit bloßem Auge noch nicht zu erkennen. Der Same war zu diesem Zeitpunkt etwa 2,5 mm lang, wog 2 mg und war rein weiß. Bis zum 10. Tag erreichten die Samen ein Gewicht von 7 mg und eine Länge von 4 mm. Der nun grüne Embryo war maximal 1 mm lang und von einem weißen, gelartigen Endosperm umgeben. Der Raum zwischen Samenschale und Endosperm (Abbildung 4) enthielt eine klare Flüssigkeit.

In dieser Flüssigkeit waren mikroskopisch keine Zellen zu erkennen. Sie nahm bis zu einem Drittel des Frischgewichtes der Samen ein, und der Gehalt cyanogener Glycoside in dieser Flüssigkeit war ähnlich hoch wie im Gewebe des Endosperms.

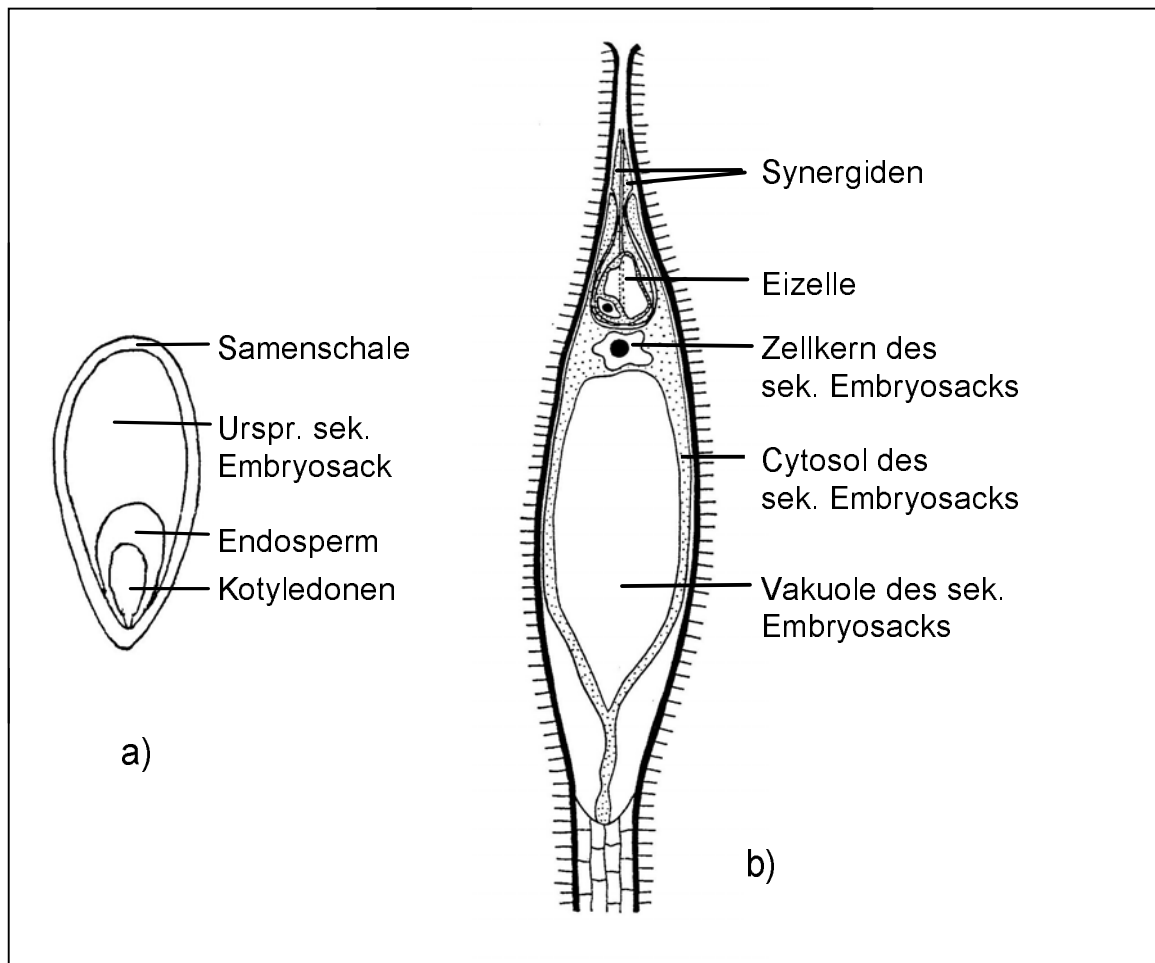


Abbildung 4: Anatomischer Bau eines Leinsamen

- a) Schnitt durch einen 12 Tage alten Leinsamen, Vergr. 10 fach
- b) schematischer Längsschnitt durch den sek. Embryosack eines Leinsamen (entnommen aus Vazart, 1968),

Bei dieser Flüssigkeit handelt es sich ursprünglich um cytologisch, vakuoläre Flüssigkeit des Embryosackes, das in dieser Entwicklungsphase eine mehrkernige Struktur aufweist. Der Embryosack hat sich bereits mehrfach geteilt, ohne dass sich einzelne Zellen durch Membran und Zellwand separiert haben (VAZART, 1969). Die Embryosackmutterzelle bildet durch eine Reduktionsteilung vier haploide Zellen, von denen nur eine die Embryosackmutterzelle überdauert und als Embryosack bezeichnet wird. Dieser wächst stark und bildet durch mehrere freie Kernteilungen zwei Synergiden, eine Eizelle, drei Antipoden und einen diploiden sekundären Embryosackkern. Nach Befruchtung des sekundären Embryosackkerns wird aus dem sekundären Embryosack das Endosperm gebildet.

In der zweiten Phase vom 12. bis ungefähr zum 25. Tag nach der Bestäubung war der Embryo auf seine endgültige Größe herangewachsen, dabei nahmen die Kotyledonen zum Ende dieser Entwicklungsphase 50 % des Samens ein. Das Endosperm verfestigte sich, es trat keine Flüssigkeit mehr aus und die Samenschale war lederartig.

Mit Beginn der dritten Phase, die etwa bis zum 40. Tag reichte, blieb das Trockengewicht nahezu konstant, während der Same immer mehr an Feuchtigkeit verlor. In den Kotyledonen wurde Chlorophyll abgebaut.

Der vierte und letzte Abschnitt der Entwicklung begann mit der Braunfärbung der Samenschale. In dieser Phase verlor der Same weiterhin Wasser, bis sein relatives Trockengewicht 92-95 % erreichte und damit den Angaben für Saatgut entsprach (LÜDTKE, 1952).

3.1.1.2 Gehalt cyanogener Glycoside in den Samenorganen

In Untersuchungen an Leinsamen konnte Sagasser (1996) zeigen, dass sich der Gehalt an cyanogenen Glucosiden im Lauf der Samenentwicklung veränderte. Dabei stellte er eine unterschiedliche Gehaltsänderung für die Mono- und Diglucoside im Prozeß der Samenreifung fest.

In dieser Arbeit zeigt Sagasser, dass das HCN-Potenzial der Samenschale fast ausschließlich durch die cyanogenen Monoglucoside Linamarin und Lotaustralin gebildet wurde. Ihr Gehalt sank während der Phase der Kotyledonenentwicklung sehr stark ab. In gleicher Weise veränderte sich der Gehalt an cyanogenen Monoglucosiden im Endosperm. Während die cyanogenen Diglucoside Linustatin und Neolinustatin in der Samenschale nur in Spuren nachzuweisen waren, stieg ihr Gehalt im Endosperm zwischen dem 10. bis 15. Tag bis auf 60 nmol/Same an und blieb dann konstant. Parallel stieg auch der Gehalt an Diglucosiden in den Kotyledonen an, in denen auch ein leichter Anstieg der Monoglucoside zwischen dem 10. und 25. Tag zu beobachten war. Diese Beobachtungen zeigten, dass das Endosperm, seiner Lage im Samen entsprechend, verbindend zwischen den Stoffwechselvorgängen in der Samenschale und den Kotyledonen steht.

Als mögliche Erklärung der beobachteten Abnahme des Blausäurepotenzials in der Samenschale und dem Endosperm sowie der Zunahme in den Kotyledonen während des Heranwachsens der Kotyledonen gibt Sagasser die direkte Glycosylierung der cyanogenen Monoglucoside zu ihren korrespondierenden

Diglucosiden und deren Verlagerung zwischen den Samenorganen an. Im Endosperm stellte er zwischen dem 10. und 15. Tag die deutlichste Steigerung des Linustatingehaltes im Gewebe fest. Zu diesem Zeitpunkt und in diesem Organ wäre, im Falle einer direkten Glucosylierung des Linamarins, mit einer hohen Aktivität einer entsprechenden Linamarin:Glucose-Glycosyltransferase zu rechnen. Das Endosperm von 12 Tage alten Leinsamen stellte daher ein sehr gut geeignetes Objekt dar und wurde für die Erfassung dieses Enzyms eingesetzt.

3.1.2 Nachweis der Linamarin : Glucose-Glycosyltransferase

Trotz experimenteller Schwierigkeiten mit Pflanzenhomogenaten konnte in dieser Arbeit die Aktivität einer Linamarin:Glucose-Glycosyltransferase in den Samen von *Linum usitatissimum* nachgewiesen werden. Die Schwierigkeiten haben ihre Ursache im Vorkommen sehr aktiver hydrolytischer Enzyme (β -Glucosidasen), die sowohl Linamarin als auch das Diglucosid Linustatin spalten (SELMAR, 1993b). In einem Enzymextrakt führten diese Enzyme somit zu einer drastischen Minderung der Substrat- als auch der Produktkonzentration der Glycosyltransferase. Um dies zu berücksichtigen wurden Extraktions- und Inkubationsbedingungen so gewählt, dass die Aktivität der β -Glucosidasen unterdrückt wurde. Eine Unterdrückung wurde durch die Wahl des Puffersystems und eines hohen pH-Wertes des Inkubationsmediums realisiert. So zeigen β -Glucosidasen in Tris-Puffer wesentlich geringere Aktivitäten als in Citrat-Phosphat-Puffer und besitzen im sauren Bereich ihr pH-Optimum (HAHLBROCK & CONN, 1970). Zudem wurde Amygdalin (nicht radioaktiv markiert) als kompetitives Substrat zugesetzt, um das gebildete Linustatin vor der Spaltung durch die hydrolytischen Enzyme zu schützen. Dennoch ließ sich in Enzymextrakten aus *Linum usitatissimum*, die mit verschiedenen Puffersystemen (z.B. Tris-HCl, Sörensen) und Schutzkomponenten (DTT, Na-Ascorbat) hergestellt wurden, keine Aktivität einer Glycosyltransferase, die Linamarin glykolysiert, nachweisen.

Dabei wurde auch berücksichtigt, dass das Versetzen der abzentrifugierten Sedimentationsrückstände einer Homogenisation mit einem Detergenz (0,5 % Triton X-100) zur Veränderung von Biomembranen und zur Freisetzung der an Membranen gebundenen Proteine führt.

Untersuchungen an *Hevea brasiliensis* zur Glucosylierung von Linamarin zeigten, dass bei einer Inkubation von intakten Vakuolen mit ^{14}C UDP-Glucose Linustatin

radioaktiv markiert wurde. Kurzhals (1993) postulierte auf Grund dieser Inkubation, dass in *Hevea brasiliensis* eine Glycosyltransferase vorkommt, die am Tonoplasten lokalisiert ist. In Anlehnung an diese Befunde wurde das Gewebe der Leinsamen möglichst unbeeinflusst für einer Inkubation eingesetzt.

Der erfolgreiche Nachweis der Aktivität einer Linamarin:Glucose-Glycosyltransferase gelang durch eine *in situ* Inkubation, bei der die Kompartimentierung in den Zellen weitgehend intakt blieb.

Das natürliche Substrat der Glycosyltransferase stellt UDP-Glucose dar, das jedoch bei intakter Kompartimentierung von den Zellen nicht aufgenommen werden kann. Da Saccharose eine universelle Transportform für Glucose ist und die Membran leicht passieren kann, wird es häufig in Experimenten als ^{14}C -Vorstufe der aktivierten Glucose appliziert. Während des für den Versuch gewünschten Samenalters stellte das Endosperm jedoch ein „source“-Organ dar, welches von außen keine Saccharose aufnimmt, so dass in diesem Fall Saccharose nicht verwendbar war. Als geeignete Glucosevorstufen wurden ^{14}C -markierte Triosephosphate angeboten, die über ständig aktive Triosephosphat-translokatoren aufgenommen werden (MOHR & SCHOPFER, 1992).

Diese aktivierten Zucker waren nicht als ^{14}C -markierte Substanzen käuflich zu erwerben, und wurden daher *in situ* dargestellt. Dazu wurde in das Endosperm der Leinsamen ^{14}C -Fruktose-1,6-bisphosphat und Aldolase injiziert. Auf diese Weise wurden im Gewebe durch die eintretende enzymatische Hydrolyse ^{14}C -Triosephosphate gebildet, die dann von den Zellen aufgenommen und weiter zu UDP-Glucose umgesetzt wurden. Linamarin, das zweite Substrat der Reaktion, wurde nicht exogen zugegeben, da es im Endosperm zu diesem Zeitpunkt in ausreichenden Mengen vorliegt (Sagasser, 1996). Diese Inkubation wurde mit fünf Samen getrennt voneinander wiederholt.

3.1.2.1 HPLC und Szintillationsspektroskopie der methanolisch extrahierten cyanogenen Glycoside

Die Samen wurden nach der Inkubation (siehe oben) gefriergetrocknet und anschließend wurde das Lyophilisat für die HPLC entsprechend den Angaben in Kapitel 2.1.3.2 vorbereitet. Der methanolische Extrakt der Reaktionsprodukte wurde über ein HPLC-System (7 % Methanol, RP18-Säule) chromatographiert. Die Detektion der getrennten Substanzen erfolgte über den Brechungsindex. Das

Eluat wurde in definierten Fraktionen aufgefangen und die darin vorhandene Radioaktivität bestimmt. In Abb. 5 ist ein Chromatogramm als repräsentatives Beispiel dargestellt und die Einteilung der für die Szintillationsspektroskopie eingesetzten Fraktionen und ihre szintillationsspektroskopischen Daten aufgeführt.

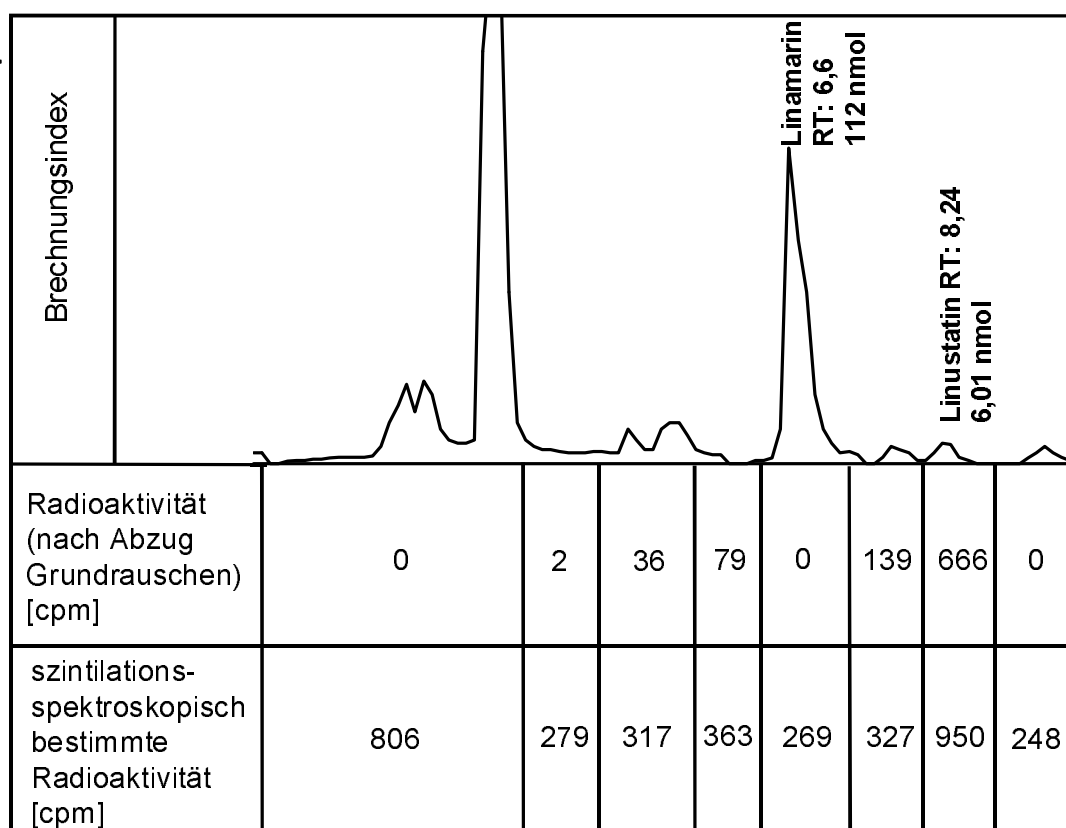


Abbildung 5: Chromatogramm des über HPLC fraktionierten Inkubationsansatzes mit szintilationsspektroskopischen Daten der gesammelten Fraktionen

Die Inkubation eines 12 Tage alten Leinsamen mit ^{14}C -Fruktose-1,6-bisphosphat (0,53 μCi) und Aldolase (0,25 U) erfolgte bei 30 °C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre. Nach Ablauf der 12-stündigen Inkubationszeit wurde der Leinsame in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die cyanogenen Glycoside wurden methanolisch extrahiert (Kapitel 2.1.3.2), über HPLC aufgetrennt und mit Hilfe des Brechungsindex quantifiziert (Kapitel 2.1.5). Das Eluat zur Retentionszeit der cyanogenen Glycoside wurde fraktioniert aufgefangen, anschließend eingeeengt und erneut über die HPLC chromatographiert. Die nach der 2. Chromatographie vorliegenden Fraktionen wurden einer Szintillationsspektroskopie unterzogen (Kapitel 2.1.4). Die Menge an Radioaktivität, die in den HPLC-Fractionen vorlag, sowie die um das Grundrauschen korrigierte Radioaktivität, ist unter dem Chromatogramm in cpm aufgeführt. Das Grundrauschen wurde als Radioaktivität ermittelt, die während der ersten Minuten eluierte, solange der Brechungsindex keine Substanz signalisierte. Dieser Wert wurde mit der jeweiligen Fraktionsgröße multipliziert. Dargestellt sind die Meßwerte aus einer von fünf parallelen Inkubationen eines Samens mit ^{14}C -Fruktose-1,6-bisphosphat.

Das Chromatogramm zeigt, dass aus den inkubierten Samen die cyanogenen Glycoside Linamarin und Linustatin extrahiert wurden. Der Gehalt an Linamarin betrug 112 nmol und lag damit im Bereich der von Sagasser (1996) für Leinsamen ermittelten Daten. Der Linustatingehalt war mit 6 nmol 20 fach unter dem des cyanogenen Monoglucosides und entsprach ebenfalls dem in der Literatur (FAN und CONN, 1985) angegebenen Gehaltes. Dies demonstriert eine vollständige Extraktion der cyanogenen Glucoside aus dem inkubierten Samen mit guter Reinigung und Trennung der einzelnen Glucoside. Die erarbeitete Extraktion und Reinigungsmethode erwies sich hiermit als gut geeignet zur Erfassung der Glycosyltransferase-Aktivität.

Die in den Fraktionen gemessene Radioaktivität verteilte sich im Wesentlichen auf zwei Fraktionen. Zum einen auf die Fraktion zu Beginn der Chromatographie, die über einen Zeitraum von 3 Minuten aufgefangen wurde. Diese enthielten noch große Mengen sehr polarer Substanzen, die durch den ersten HPLC-Lauf nicht vollständig abgetrennt werden konnten. Zum anderen war in der Fraktion, die zur Retentionszeit des Linustatins aufgefangen wurde, ebenfalls eine hohe Radioaktivität zu detektieren. Über den gesamten Verlauf des Chromatogramms wurde ein Grundrauschen an Radioaktivität von ca. 200 cpm/min festgestellt. Berücksichtigt man dieses Grundrauschen bei der Auftragung der Radioaktivität, zeigte sich die radioaktive Markierung in der Linustatinfraktion noch deutlicher (Abbildung 6). Das Linamarin, das vor dem Linustatin eluiert, trug fast keine radioaktive Markierung.

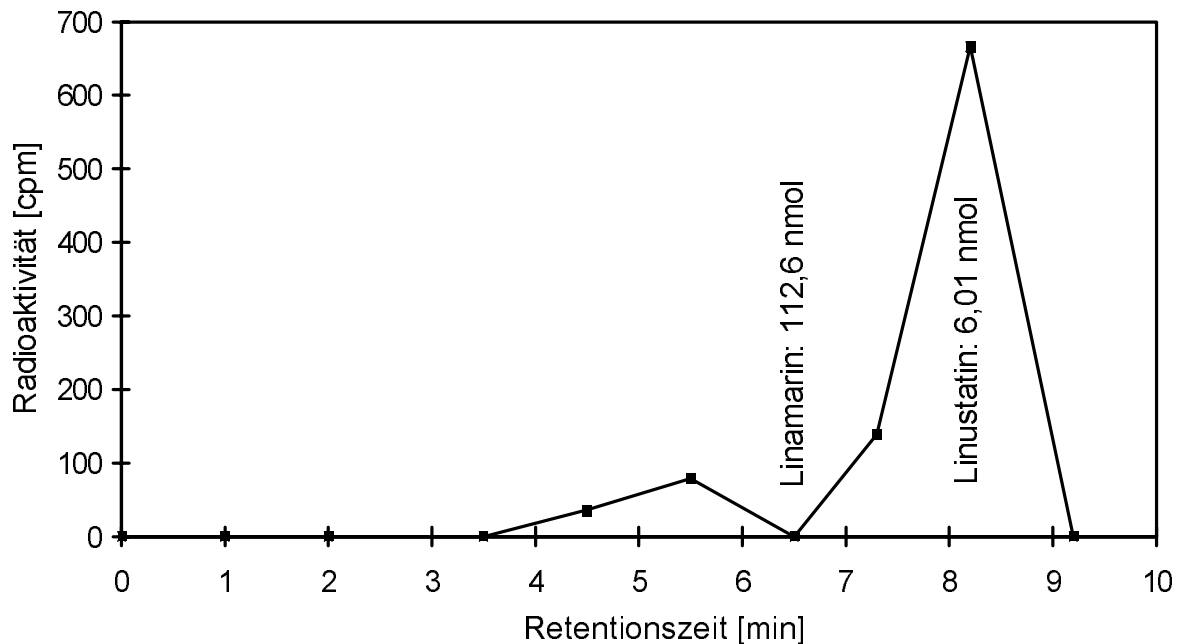


Abbildung 6: Radioaktivität der HPLC Fraktionen in Abhängigkeit von der Retentionszeit

Die cyanogenen Glycoside wurden methanolisch extrahiert und anschließend über HPLC aufgetrennt (Kapitel 2.1.3.2 und 2.1.5). Die nach der Chromatographie vorliegenden Fraktionen wurden einer Szintillationsspektroskopie unterzogen (Kapitel 2.1.4). Der Gehalt der cyanogenen Glycoside wurde über die Peakfläche in Relation zur Peakfläche eines definierten Standards bestimmt. Dargestellt sind die Meßwerte aus einer von fünf parallelen Inkubationen eines Samens mit ^{14}C -Fruktose-1,6-bisphosphat.

In Abbildung 6 wurde die gemessene Radioaktivität gegen die Retentionszeit aufgetragen. In dieser Darstellung wird die starke radioaktive Markierung des Linustatins deutlich. Als spezifische Radioaktivität ergab sich für das Linustatin bei einem Gehalt von 6 nmol/Same ein Wert von 110 cpm/nmol.

3.1.2.2 Lokalisation der radioaktiven Markierung im Linustatin

Wie die oben dargestellten Ergebnisse zeigen, trug das aus den Samen extrahierte Linustatin eine starke radioaktive Markierung. Prinzipiell könnte diese Markierung an der terminalen Glucose des Linustatins vorliegen und während der Glucosylierung des Linamarins erfolgt sein oder auf Grund einer *de novo* Synthese des Linustatins an beiden Glucosen vorliegen.

Um diese Frage zu beantworten, wurde das aus der Inkubation der Leinsamen mit ^{14}C -Fruktose-1,6-bisphosphat erhaltene Linustatin mit einer sequentiellen Diglucosidase, die spezifisch nur die terminale Glucose hydrolysiert, inkubiert (Kapitel 2.1.3.3.2).

Dieses Enzym stammt aus *Hevea brasiliensis* und lag als reine Enzymfraktion vor (HILLMAR, 1999). Es handelt sich um ein Enzym, das an den Metabolisierungs- und Transportvorgängen von cyanogenen Glycosiden beteiligt ist.

Die Produkte der enzymatischen Hydrolyse des Linustatins wurden erneut über HPLC chromatographiert und die Radioaktivität der einzelnen Produkte szintillationsspektroskopisch analysiert.

Die durch Brechungsindexdetektion und Szintillationsspektroskopie erhaltenen Daten sind in Abbildung 7 dargestellt.

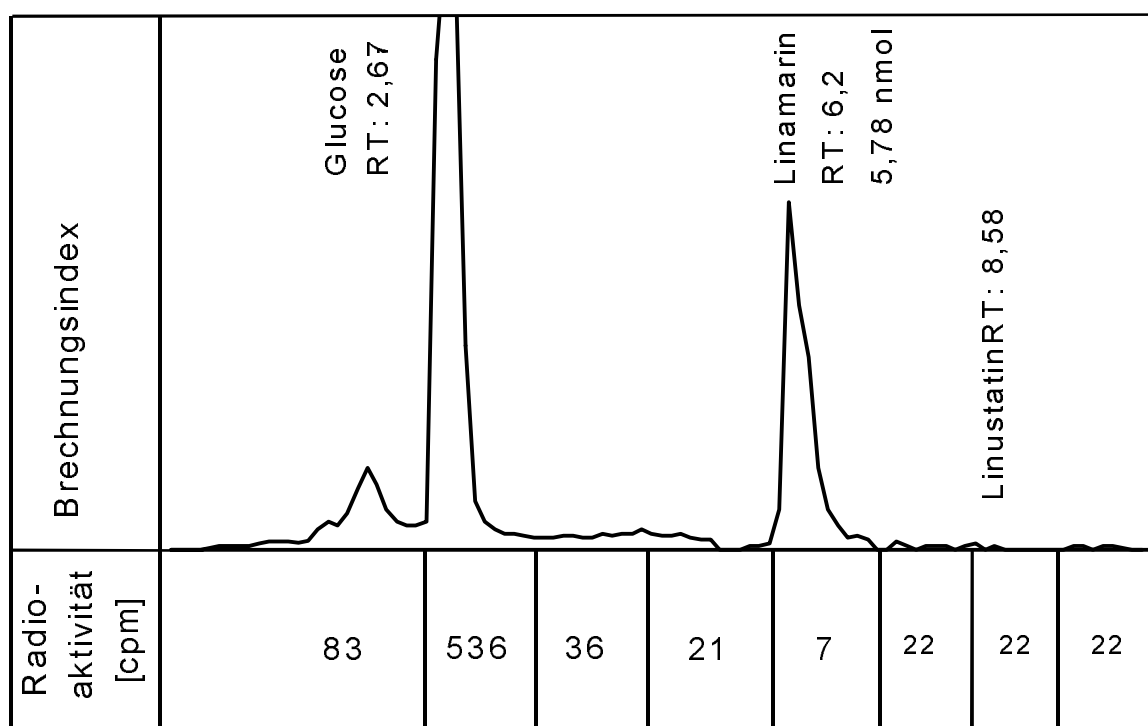


Abbildung 7: Chromatogramm des enzymatisch hydrolysierten Linustatins mit szintillationsspektroskopischen Daten der gesammelten HPLC - Fraktionen

Das radioaktiv markierte Linustatin aus dem inkubierten Samen wurde mit einer sequentiellen Diglucosidase wie in Kapitel 2.1.3.3.2 beschrieben inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Ansatz in flüssigem Stickstoff schockgefroren und lyophilisiert (Kapitel 2.1.3.2). Die cyanogenen Glycoside wurden aus dem Lyophilisat methanolisch extrahiert und anschließend über HPLC aufgetrennt (Kapitel 2.1.5). Die nach der Chromatographie vorliegenden Fraktionen wurden einer Szintillationsspektroskopie unterzogen (Kapitel 2.1.4). Die Menge an Radioaktivität, die in den HPLC-Fractionen vorlag, ist unter dem Chromatogramm in cpm aufgeführt.

In dem Chromatogramm ist deutlich zu erkennen, dass das Linustatin quantitativ durch die sequentielle Diglucosidase hydrolysiert wurde und zwar ausschließlich zu den Produkten Linamarin und Glucose. Dabei trug nur die hydrolytisch

abgetrennte Glucose eine radioaktive Markierung. Das extrahierte Linamarin, das aus dem Linustatin hervorging, war in der proximalen Glucose nicht weiter radioaktiv markiert. Die Markierung des Linustatins beruhte damit ausschließlich in einer Markierung der terminalen Glucose. Somit konnte die Schlußfolgerung gezogen werden, dass Linamarin zu Linustatin glycolysiert wurde und somit in Leinsamen eine entsprechende Glycosyltransferase vorkommt.

Zusammenfassung des Kapitels 3.1.2:

Durch die Inkubation von 12 Tage alten Leinsamen mit ^{14}C -Fruktose-1,6-bisphosphat und Aldolase konnte gezeigt werden, dass in Samen gebildetes Linustatin durch Glucosylierung von Linamarin entstanden ist und nicht *de novo* synthetisiert wurde. Die radioaktive Markierung aus dem ^{14}C -Fruktose-1,6-bisphosphat wurde ausschließlich in der terminalen Glucose des Linustatins detektiert.

Somit konnte gefolgert werden, dass in Leinsamen eine Linamarin:Glucose-Glycosyltransferase vorkommt, die Linamarin zu Linustatin glucosyliert.

3.2. Bestimmungen der Aufnahme cyanogener Glucoside

Neben der Glucosylierung des Linamarins zum Linustatin steht in dieser Arbeit die Aufnahme und der Aufnahmemechanismus von cyanogenen Glucosiden in die Zellen im Mittelpunkt. Diese Untersuchungen wurden an Zellkulturen durchgeführt, die zunächst aus Kallus von Sprossexplantaten etabliert wurden. Zusätzlich wurden diese Aufnahmeuntersuchungen auf transformierte Wurzelkulturen ausgedehnt, die ebenfalls als Flüssigkultur angelegt wurden.

3.2.1 Optimierung der Bedingungen zur Kallusinduktion und Kalluskultur

Die Voraussetzung für die Etablierung einer Zellsuspensionskultur ist gut wachsender Kallus. Mit dem Ziel, gut wachsenden Kallus zu induzieren und zu kultivieren, wurden Sprossexplantate von steril angezogenen Leinpflanzen unter verschiedenartigen Bedingungen auf ihre Fähigkeit zur Kallusbildung getestet.

Anhand der in Kapitel 2.2.3.2 aufgeführten Auswahlkriterien konnte gut wachsender Kallus selektiert und für die Etablierung einer Zellsuspensionskultur genutzt werden.

Auf welche Weise die Kallusbildung und das weitere Wachstum dabei von der Konzentration der Mikro- und Makronährelemente abhängig waren, ist in den nachfolgenden Kapiteln beschrieben. Dabei war besonders die Art und Konzentration der Phytohormone von Bedeutung.

3.2.1.1 Kallusinduktion und Selektion eines gut wachsenden Kallus

Zur Induktion und weiteren Kultivierung von Kallus aus *Linum usitatissimum* beschrieben Schaumann et al. (1993) ein MS Nährmedium mit reduzierten Konzentrationen an Makronährelementen. Dieses Medium (L1) und daran angelehnt noch drei weitere Variationen (L2-L4) wurden auf ihre Eignung als Induktionsmedium für Kallus aus *Linum usitatissimum* untersucht. Die Selektion, ob sich der induzierte Kallus für das Anlegen einer Zellsuspensionskultur eignet, erfolgte nach den in Kapitel 2.2.3.2 beschriebenen Kriterien.

Die erste Passage des vom Primärexplantat isolierten Kallusgewebes erfolgte zwischen dem 8. und 20. Tag nach der Induktion.

Der Kallus wurde in den ersten drei Monaten in unregelmäßigen Abständen auf frisches Medium überführt. Die Passage erfolgte nach 4 bis 16 Tagen, sobald sich Anzeichen von Verbräunung des Gewebes zeigten.

3.2.1.1.1 Kallusinduktion auf L1-Medium

Bei dem Medium L1 handelte es sich um das von Schaumann et al. (1993) zur Kallusinduktion von *Linum usitatissimum* eingesetzte Medium. Auf diesem Medium bildete sich nach 14 Tagen primärer Kallus an den Explantaten, der nach 18 Tagen abgetrennt und erneut auf dieses Medium überimpft wurde.

Der Kallus hatte eine weiße Farbe, war wässrig und zeigte ein langsames Wachstum. Nach weiteren vier Passagen auf diesem Medium wurde der Kallus gelblich weiß und wuchs deutlich schneller, er zeigte in 14 Tagen nahezu eine Verdoppelung sein Größe. Da der Kallus aber weiterhin eine wässrige, nicht schnittfeste Konsistenz aufwies, die ihn für das Anlegen einer Zellsuspensionskultur ungeeignet macht, wurde die Kultivierung diese Linie nach 3 Monaten eingestellt.

3.2.1.1.2 Kallusinduktion auf L2-Medium

Dieses Medium hat nahezu die gleiche Zusammensetzung wie das L1-Medium, nur wurde kein Casein zugesetzt. Auch dieses Medium führte zur Induktion von

Kallus aus Sprossexplantaten. Wie auf dem L1-Medium bildete sich nach etwa 12 Tagen Primärkallus an den Sprossfragmenten. Da sich aber nur wenig Kallus gebildet hatte, konnte die erste Passage erst nach einer weiteren Woche erfolgen. Der gebildete Primärkallus war ebenfalls weißlich-gelb und hatte eine wässrige Konsistenz. Aufgrund seiner wässrigen Struktur zeigte auch dieser Kallus nach den beschriebenen Auswahlkriterien (siehe Kapitel 2.2.3.2) kein gutes Wachstum und wurde daher nicht weiter kultiviert.

3.2.1.1.3 Kallusinduktion auf L3-Medium

Das L3-Medium unterschied sich in seiner Zusammensetzung von den vorhergehenden in seiner Stickstoffkonzentration. Sowohl die Nitrat- als auch die Ammoniumkonzentration wurden um die Hälfte reduziert.

Sprossexplantate, die auf diesem Medium kultiviert wurden, bildeten einen hellgrünen Primärkallus mit gelblichem Schimmer. Die erste Passage erfolgte 13 Tage nach der Induktion. Nach weiteren 12 Tagen war die Kallusfärbung gelb und es kam zur Ausbildung von Adventivwurzeln. Die zweite Passage wurde daraufhin auf L3-Medium mit reduziertem Auxingehalt (L3.1) durchgeführt. Da der Kallus auch auf diesem Medium mit Adventivwurzeln wuchs, wurde in der dritten (L3.2) und vierten (L3.3) Passage die Konzentration an Auxinen im Medium weiter schrittweise verringert. Mit einer Auxinkonzentration von 11,2 $\mu\text{mol/L}$ IAA und 0,45 $\mu\text{mol/L}$ 2,4-D wurde ein Kalluswachstum ohne die Bildung von Wurzelstrukturen erreicht. Im Verlauf dieser Variation der Hormonkonzentration änderte sich die Farbe des Gewebes von gelbe zu gelb-braun und die Struktur wurde hart. Auf Grund dieser nicht optimalen Eigenschaften und des Vorhandenseins einer besser wachsenden Kalluslinie wurde diese Linie weiter kultiviert, aber nicht für eine Zellsuspensionskultur genutzt.

3.2.1.1.4 Kallusinduktion auf L4-Medium

Im Gegensatz zu allen anderen besitzt das L4-Medium mit 60 mmol/L Gesamtstickstoffgehalt eine deutlich höhere Stickstoffkonzentration. Die Mikro-, Makro- und Vitamin-Zusammensetzung dieses Mediums entspricht der Rezeptur von Murashige und Skoog (1962). Auch die Hormonkonzentration unterscheidet sich grundlegend von den Medien L1 und L2. Die Konzentration an Kinetin ist mit 0,9 $\mu\text{mol/L}$ im Vergleich zum Medium L1 und L2 (16 $\mu\text{mol/L}$) deutlich geringer,

ebenso die Konzentration des Auxins 2,4-D ($0,45 \mu\text{mol/L}$ in L4 gegenüber $5 \mu\text{mol/L}$ in L1-2).

Dieses Medium erwies sich als sehr geeignet zur Induktion von Primärkallus aus Sprossexplantaten von *Linum usitatissimum*. Bereits nach 5 Tagen hatte sich Kallusgewebe an den Schnittflächen der Sprosse gebildet, das ein sehr gutes und schnelles Wachstum zeigte (siehe Kriterien für gutes Kalluswachstum, Kapitel 2.2.3.2). Der Kallus war hellgelb und seine Struktur sehr fest. Auf Grund dieser sehr festen Struktur wurden die gebildeten Kallusstücke acht Tage nach der Induktion auf L4.1-Medium mit einer erhöhten 2,4-D Konzentration von $0,9 \mu\text{mol/L}$ transferiert. Im Anschluss daran verringerte sich die Festigkeit des Gewebes deutlich. Nach einer weiteren Passage auf dieses Medium bildete der Kallus jedoch Adventivwurzeln, so dass er bei der 3. Passage auf ein L4.2 Medium mit erhöhter Cytokininkonzentration ($5 \mu\text{mol/L}$ BAP) überführt wurde. Die 4. Passage erfolgte auf ein Medium mit $1,8 \mu\text{mol/L}$ 2,4-D, $0,9 \mu\text{mol/L}$ Kinetin, $11,4 \mu\text{mol/L}$ IAA und $5 \mu\text{mol/L}$ BAP (L4.3), daraufhin zeigte der Kallus keine neuen Adventivwurzeln und seine Struktur wurde schnittfest, aber nicht hart.

Da diese Kalluslinie die oben genannten Auswahlkriterien erfüllte, wurde sie als Stammkultur weiter kultiviert und als Ausgangsmaterial für die Zellsuspensionskultur eingesetzt.

In Abbildung 8 sind die Stationen und Ergebnisse der Induktionen auf unterschiedlichen Medien zusammenfassend dargestellt:

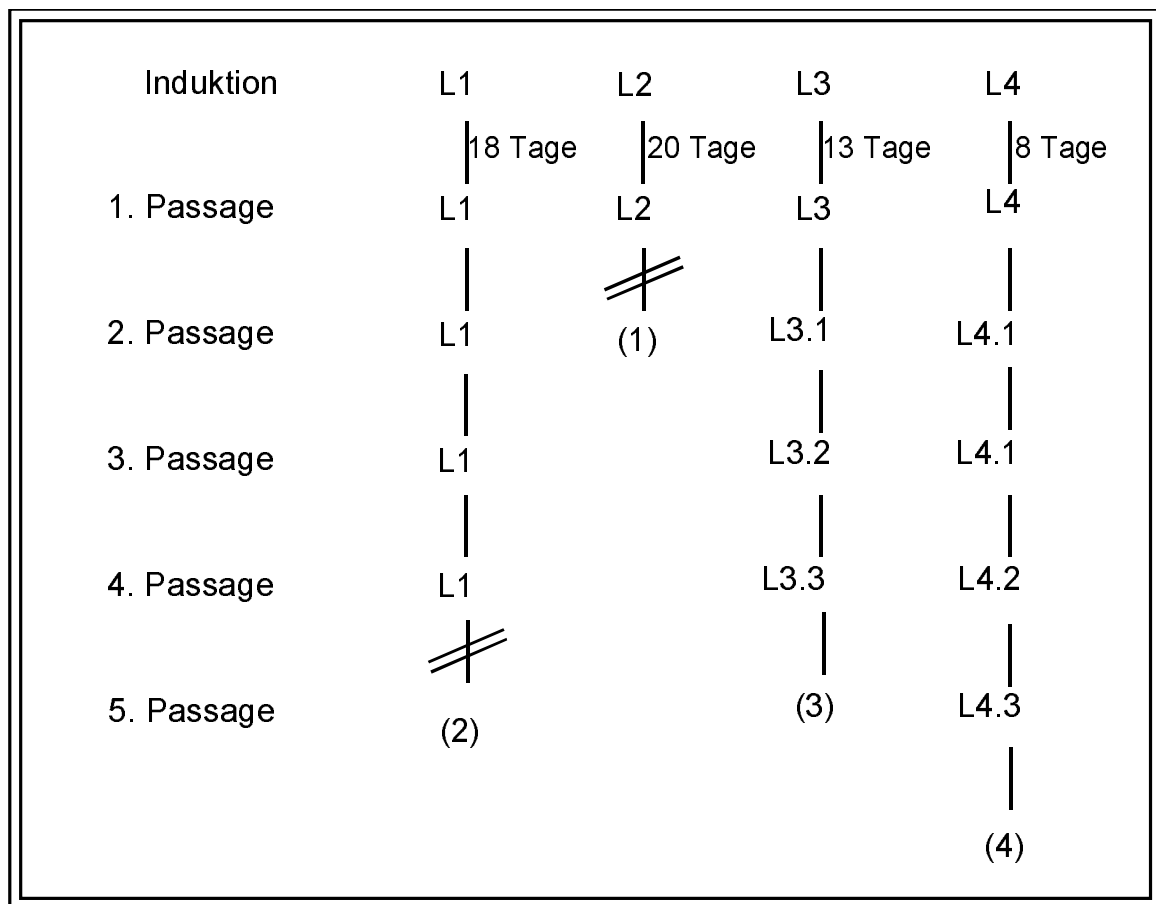


Abbildung 8: Stationen der Kalluskultivierung von *Linum usitatissimum*

Zur Induktion des Kallus wurden sterile Sprossabschnitte von Leinpflanzen verwendet, die auf vier verschiedene Medien ausgelegt wurden, die Subkultur des Kallus erfolgte auf Petrischalen mit verfestigtem Medium entsprechender Zusammensetzung. Die detaillierte Zusammensetzung der Medien und die genaue Durchführung sind in den Kapiteln 2.2.2 und 2.2.3 dargestellt.

- (1): der Kallus zeigte ein mittelschnelles Wachstum, seine Struktur war sehr wässrig, seine Farbe war gelblich-weiß; die Linie wurde eingestellt.
- (2): dieser Kallus zeigte ein langsames Wachstum und hatte eine wässrige Struktur; auch diese Linie wurde eingestellt.
- (3): das Kallusgewebe war gelb-braun gefärbt, hatte eine sehr feste Struktur und zeigte ein schnelles Wachstum
- (4): der Kallus hatte eine weiß-gelbe Farbe und eine schnittfeste Struktur und zeigte ein schnelles Wachstum; er wurde zum Anlegen einer Zellsuspensionskultur verwendet.

Alle vier eingesetzten Medien (L1 - L4) haben zur Bildung von Kallus aus *Linum usitatissimum* geführt und waren somit grundsätzlich zur Induktion geeignet. Die Kallusinduktion war am erfolgreichsten, wenn das Induktionsmedium 60 mmolar Stickstoff als Ammoniumnitrat und Kaliumnitrat enthielt und als Phytohormone Kinetin und die beiden Auxine 2,4D und IAA enthalten waren (L4-Medium).

Dennoch waren die resultierenden Kalluskulturen nicht gleichermaßen für die Etablierung einer Zellsuspension geeignet, so dass zwei der Kalluslinien eingestellt wurden. Die verbleibenden Zelllinien (L3.3 und L4.3) wurden als Stammkultur weiter kultiviert und aus der Kalluslinie, die auf L4.3-Medium wuchs, wurde eine Zellsuspensionskultur angelegt.

3.2.1.2 Stammhaltung des Kallus aus *Linum usitatissimum*

Nachdem die Phytohormonkonzentration in den Medien variiert wurde, bildeten sich zwei Linien (L3.3 und L4.3), deren Kallus dauerhaft zur Stammhaltung verwendbar waren. Zum Anlegen einer Suspensionkultur diente nur die Kalluslinie auf L4-Medium. In Tabelle 6 sind die eingesetzten Medien zur Induktion und späteren Stammhaltung des Kallus zusammengefasst.

Tabelle 6: Medien zur Induktion und Stammhaltung von Kallus aus *Linum usitatissimum*

Der Kallus wurde auf mit Agar verfestigten Medien in Petrischalen induziert und subkultiviert, detaillierte Medienrezepturen sind in Kapitel 2.2.2 dargestellt.

| Medium f. Induktion | Phytohormone [$\mu\text{mol/L}$] | | | Medium f. Subkultur | Phytohormone [$\mu\text{mol/L}$] | | | |
|------------------------|------------------------------------|-------|------|------------------------|------------------------------------|-------|------|-----|
| | Kinetin | 2,4-D | IAA | | Kinetin | 2,4-D | IAA | BAP |
| L 3 | 0,9 | 1,8 | 22,9 | L 3.3 | 0,9 | 0,45 | 11,4 | 0 |
| L 4 | 0,9 | 0,45 | 11,4 | L 4.3 | 0,9 | 1,8 | 11,4 | 5 |

Zusammenfassend kann die in Kapitel 3.2.1 beschriebene Gewinnung des Kallus von Leinsprossen wie folgt dargestellt werden: Alle verwendeten Medien, die von einem von Murashige und Soog entwickelten Medium abgeleitet sind, führten zu einer Bildung von primärem Kallus an den Sprossexplantaten und waren grundsätzlich zur Kallusinduktion geeignet. Die Kallusinduktion war am erfolgreichsten, wenn das Induktionsmedium 60 mmolar Stickstoff als Ammoninitrat und Kaliumnitrat enthielt und als Phytohormone Kinetin und die beiden Auxine und IAA und 2,4D zugesetzt waren. Nachdem die Phytohormonkonzentration in diesen Medien variiert wurde, bildeten sich zwei

Linien (Medium L4.3 und L3.3), deren Kallus ein gutes Wachstum zeigte und daher dauerhaft zur Stammhaltung eingesetzt wurde. Der Kallus der L4.3-Linie wurde zum Anlegen einer Suspensionkultur verwendet.

3.2.2 Etablierung einer Zellsuspensionskultur aus Kallus von *Linum usitatissimum*

Bei der Etablierung einer Zellsuspension aus Kallus werden mehrere charakteristische Phasen durchlaufen, in denen eine allmähliche Anpassung der Zellen an die veränderten Kulturbedingungen erfolgt. In diesem Teil der Arbeit werden die Bedingungen, die zur erfolgreichen Etablierung einer Zellsuspensionskultur aus *Linum usitatissimum* geführt haben, dargestellt.

Zur Etablierung einer Zellsuspensionskultur wurde der aus Sprossexplantaten induzierte Kallus verwendet. Eingesetzt wurde Kallus der Linie, die auf L4Medium induziert wurde. Nach zwei Passagen auf L4.1-Medium wurde dieser Kallus auf L4.2.- und nach einer weiteren Passage auf L4.3.-Medium transferiert. Nachdem der Kallus viermal auf L4.3-Medium passagiert worden war, erfolgte die Inokulation in L4.3-Flüssigmedium.

3.2.2.1 Allgemeine Gliederung der Etablierung einer Zellsuspension

Die Etablierung der Zellsuspensionskultur findet in drei aufeinanderfolgenden Phasen statt, in denen sich die Zellen schrittweise an die veränderten Kulturbedingungen anpassen.

Phase 1

In dieser Phase passt sich das Kallusgewebe an die veränderten äußeren Bedingungen, wie Flüssigmedium und Sauerstoffangebot, an. Durch die Schüttelbewegungen werden an der Peripherie des Kallusgewebes einzelne Zellen oder mikroskopisch kleine Zellaggregate abgelöst, so dass im Flüssigmedium neben dem Ursprungsgewebe auch feines Zellmaterial existiert. Phase 1 umfasst den Zeitraum vom Start der Inokulation bis zum ersten Transfer des feinen Zellmaterials in neues Medium.

Phase 2

Ausgehend von dem abgetrennten feinen Zellmaterial entwickelt sich in dieser Phase eine heterogene Zellsuspension. Neben Einzelzellen verschiedener Formen, von rund über oval bis länglich, liegen Zellaggregate, die in ihrer Größe stark variieren, in der Suspension vor. Während dieser Phase wird das fein wachsende Zellmaterial im Abstand von 10-14 Tagen immer wieder abgetrennt und weiterkultiviert. Durch diese Selektion erfolgt über mehrere Monate ein langsamer Übergang der Suspension in die dritte Etablierungsphase.

Phase 3

In der letzten Phase besteht die Zellsuspension überwiegend aus kleinen Zellaggregaten von 1-3 mm Durchmesser. Einzelzellen und wenigzellige Aggregate treten nur selten auf. Eine Kultur in dieser Form wird als homogene Zellsuspension bezeichnet.

3.2.2.2 Beschreibung der Etablierungsphasen für eine Zellsuspension aus *Linum usitatissimum*

Phase 1:

Bereits 4 Tage nach der Inokulation des Kallus enthielt das Flüssigmedium sowohl einige wenige Gewebefragmente als auch Einzelzellen. Nach 14 Tagen hatte die Anzahl dieser sehr unterschiedlich großen Aggregate stark zugenommen, und sie wurden durch Filtration über ein Nygonsieb (Porengröße 2 mm) von dem Ursprungsgewebe abgetrennt und anschließend in neues Medium transferiert.

Phase 2:

Der Anteil der größeren Zellaggregate nahm kontinuierlich zu. Die Passage der feinen Zellfragmente erfolgte zunächst im Abstand von 10 Tagen, da sich danach eine Verbräunung einiger Fragmente einstellte. Später war es möglich die Zellen im Abstand von 14 Tagen umzusetzen. Während in den ersten Monaten noch sehr unterschiedlich große Aggregate vorlagen, wurde durch sorgfältiges selektives Passagieren der feinen Zellfraktion eine homogene Suspension erzielt.

Phase 3:

Sieben Monate nach der Inokulation des Kallusgewebes war es gelungen eine homogene Zellsuspensionskultur von *Linum usitatissimum* zu etablieren (siehe Abbildung 9). Sie enthielt Zellaggregate von 3 mm Durchmesser, die eine gelbe Farbe aufwiesen.

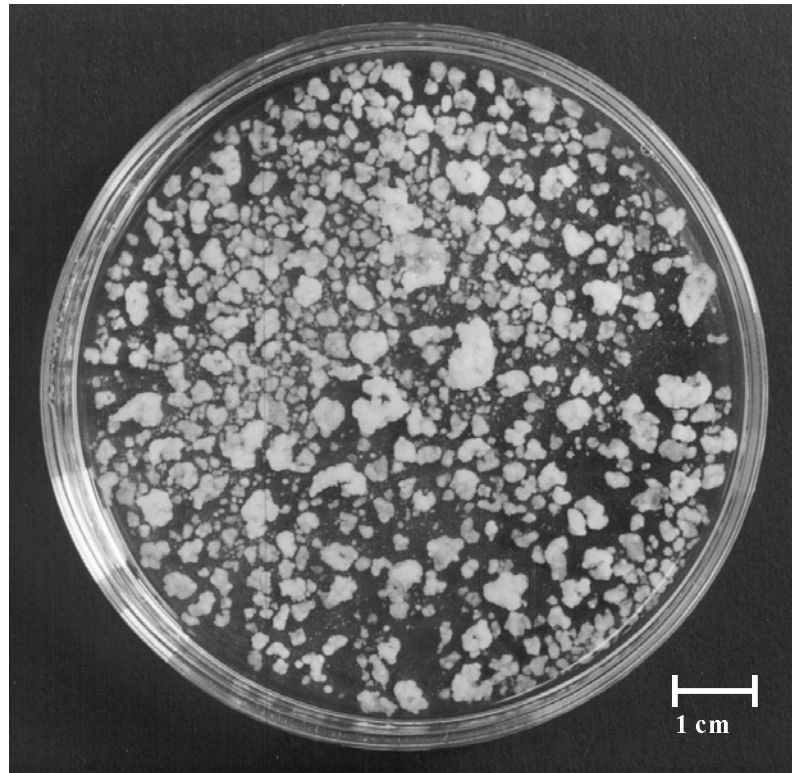


Abbildung 9: Zellsuspensionskultur von *L. usitatissimum* aus Kallus

Die abgebildete Suspension befindet sich in Phase drei der Etablierung, 6 Monate nach der Inokulation des Kallus in L 4.3-Flüssigmedium. Die Größe der Aggregate variiert nur noch sehr wenig. Die Suspension wurde vier Tage zuvor passagiert.

3.2.3 Beschreibung der Inkulturnahme von transformierten Leinwurzeln in Flüssigkultur

Neben einer Zellsuspensionskultur wurde ebenfalls eine Flüssigkultur von schnell wachsenden Wurzeln aus *Linum usitatissimum* und *Linum atalante* angelegt. Für die Wurzelkulturen standen Kulturen auf verfestigtem Medium von Frau Dr. I. Kuzovkina (K.A. Timirjazev Institut für Pflanzenphysiologie, Moskau) zur Verfügung. Bei der Etablierung einer Flüssigkultur aus Wurzeln müssen sich diese Gewebe allmählich an die veränderten Kulturbedingungen anpassen. In diesem Kapitel werden die Bedingungen, unter denen eine Wurzelflüssigkultur

aus *Linum usitatissimum* und *Linum atalante* erfolgreich etabliert wurde, dargestellt.

Für die Inkulturnahme der Flüssigkulturen wurden mit *Agrobacterium rhizogenes* (Stamm LBA9402) transformierte Wurzeln eingesetzt. Die erfolgreiche Transformation konnte über den Nachweis bakterienspezifischer Opine nachgewiesen werden (PETIT et al., 1986). Die Wurzeln wurden vor der Inokulation in Flüssigmedium über mehrere Jahre auf mit Agar verfestigtem Medium kultiviert.

Die auf Petrischalen kultivierten Wurzeln wachsen als bräunlich-weißes Geflecht stark verzweigter Wurzeln, dabei sind die jungen Abschnitte an der Peripherie dieses Geflechtes zu finden. Für die Inokulation wurden zusammenhängende Randabschnitte des Geflechtes eingesetzt, die viele meristematische Wurzelspitzen enthielten und noch keine Verbräunung zeigten.

Erst nach 22 Tagen konnte ein Wachstum an den Wurzelspitzen in Flüssigkultur festgestellt werden, da sich die Gewebestücke erst an die neuen äußeren Bedingungen, wie Flüssigmedium und verändertes Sauerstoffangebot, anpassen mussten. Nachdem in den nächsten 10 Tagen ein deutliches Wachstum der Wurzeln zu beobachten war, wurde das entstandene Wurzelgewebe von den ursprünglichen Wurzeln abgetrennt und in neues Medium überführt. Im weiteren Verlauf der Kultur wurden immer wieder meristematische Randbereiche der Wurzelmasse im Abstand von 21 Tagen in neues Medium passagiert.

Da die zur Verfügung gestellten Wurzeln in Petrischalen über den Luftweg aus Moskau transportiert wurden, konnte eine Kontamination durch die starken Klimaveränderungen und die dadurch verursachte Bildung von Kondenswasser nicht ausgeschlossen werden. Auf Grund dessen wurde dem Medium bei den ersten 3 Passagen der Wurzeln das Antibiotikum Cefataxime (0,5 g/L) zugesetzt, um einer Kontamination von Bakterien entgegen zu wirken.

Nach 6 Monaten zeigten die Wurzelflüssigkulturen ein gleichmäßiges, gutes Wachstum einer stabilen Flüssigkultur (siehe Abbildung 10 und 11). Die etablierten Kulturen wurde für weitere Untersuchungen eingesetzt.

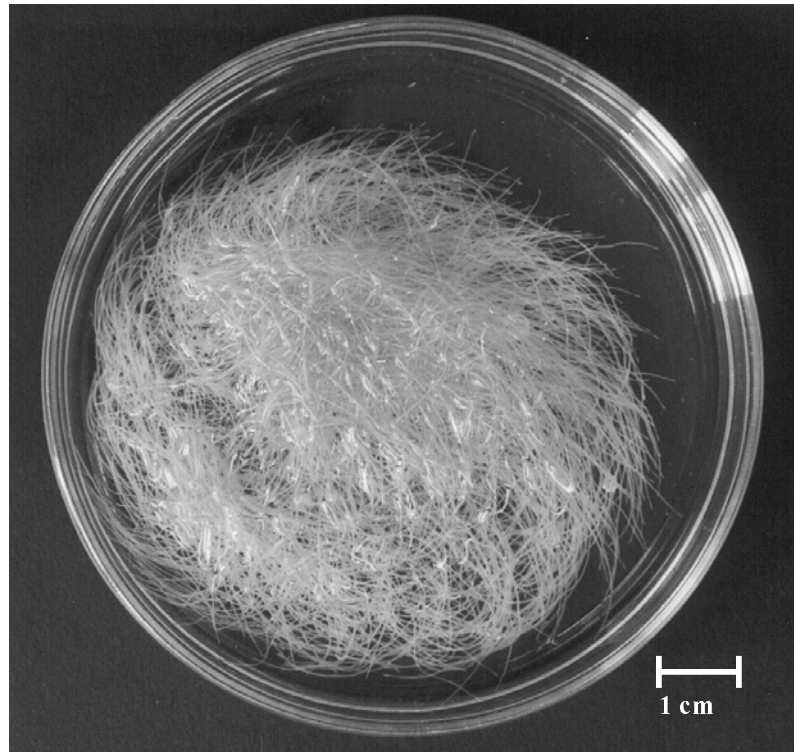


Abbildung 10: Wurzelflüssigkultur von *L. usitatissimum*

Die abgebildete Flüssigkultur wurde 6 Monate in MS-Basalmedium (Tabelle 1) kultiviert. Eine Passage erfolgte im Abstand von 21 Tagen, die letzte Passage erfolgte 16 Tage zuvor.

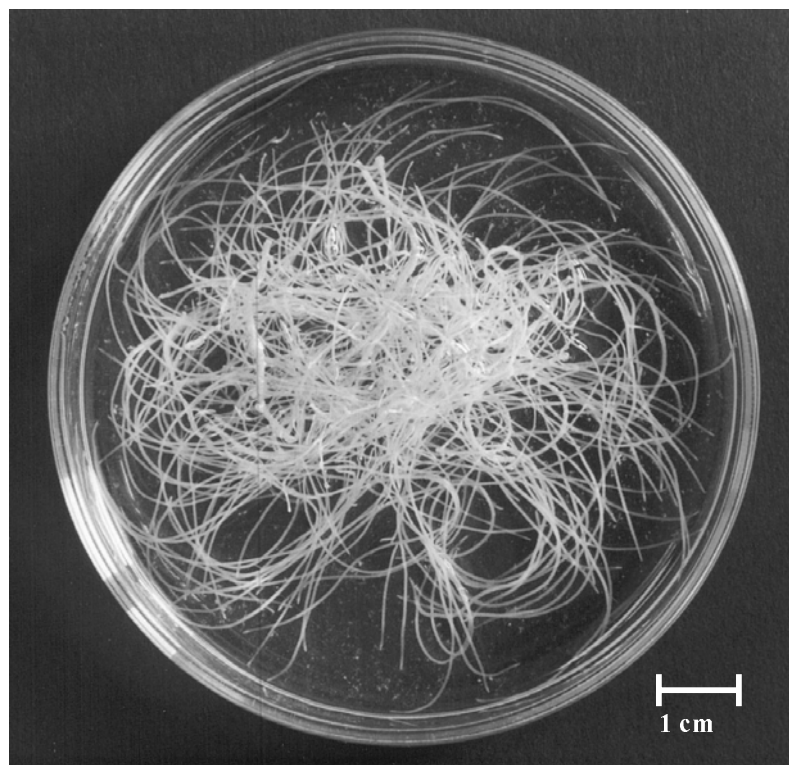


Abbildung 11: Wurzelflüssigkultur von *L. atalante*

Die abgebildete Flüssigkultur wurde 6 Monate in B5-Basalmedium nach Gamborg (Tabelle 2) kultiviert. Eine Passage wurde im Abstand von 21 Tagen durchgeführt, die letzte Passage erfolgte 10 Tage zuvor.

3.2.4 Wachstumszyklen der Zellsuspensionskultur und der Wurzelflüssigkultur aus *Linum usitatissimum*

Um pflanzliche Zellsuspensionen und Wurzelflüssigkulturen für physiologische und biochemische Untersuchungen einsetzen zu können, ist es notwendig, ihr Wachstumsverhalten unter den vorhandenen Standardkulturbedingungen zu kennen. Suspensionskulturen zeigen vom Zeitpunkt des Animpfens bis zur nächsten Subkultivierung einen charakteristischen Wachstumsverlauf, der als „Wachstumszyklus“ bezeichnet wird (STREET, 1977). Auch Wurzeln, die in Flüssigkultur gehalten werden, folgen einem derartigen Wachstumszyklus.

Die in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse wurden außerdem für den Vergleich der Zellsuspension und der Wurzelflüssigkultur untereinander und dem bei Street (1977) beschriebenen, standardisierten Wachstumszyklus genutzt. Um das Wachstumsverhalten dieser beiden Suspensionskulturen zu beschreiben, wurde ihr Frisch- und ihr Trockengewicht über einen Zeitraum von 20 bzw. 22 Tagen ermittelt. Der Zustand der Suspensions- bzw. Flüssigkulturen wurde durch die Bestimmung des pH-Wertes, der Leitfähigkeit und des Saccharosegehaltes im Kulturmedium während des Wachstumszyklus noch weiter charakterisiert.

Der Wachstumsverlauf in Suspensionskulturen lässt sich in fünf aufeinanderfolgende Abschnitte untergliedern (WILSON, KING & STREET, 1971) :

Der anfänglichen Phase langsamen Wachstums (lag-Phase) folgt eine kurze Phase exponentiellen Wachstums, die als log-Phase bezeichnet wird und durch eine starke Zellteilungsaktivität gekennzeichnet ist. Daran schließt sich eine Phase linearen Wachstums an, die in eine Phase deutlich verzögerten Wachstums übergeht. Zum Ende des Zellzyklus folgt eine stationäre Phase ohne messbares Wachstum der Zellen.

3.2.4.1 Charakterisierung der Suspension aus Kallus

3.2.4.1.1 Frisch- und Trockengewicht einer Zellsuspensionskultur aus *Linum usitatissimum*

Der Verlauf des Wachstums der Zellsuspensionskultur wurde in einem Zeitraum von 20 Tagen über das Frisch- und Trockengewicht bestimmt (siehe Abbildung 12). Diese beiden Parameter steigen mit der Zunahme der Zellzahl kontinuierlich

an. Der Vergleich von Frisch- und Trockengewicht liefert zusätzliche Informationen über den Wassergehalt der Zellen und damit über den Grad der Vakuolisierung.

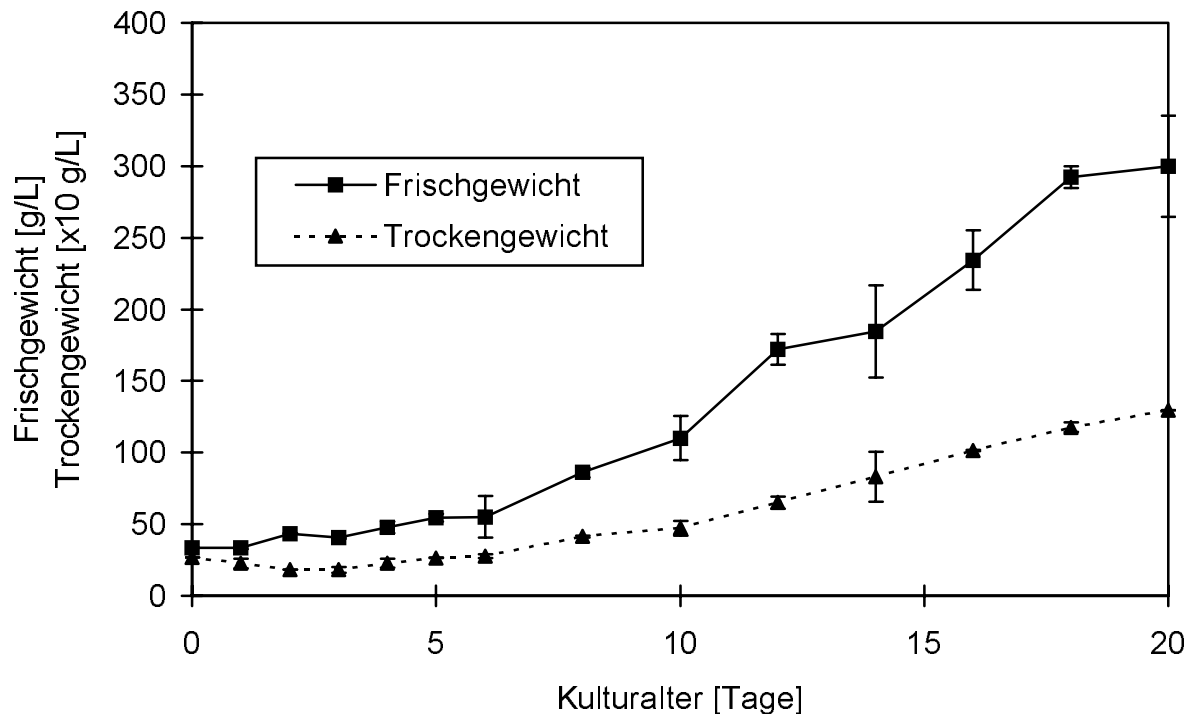


Abbildung: 12 Frisch- und Trockengewicht der Zellsuspensionskultur in Abhängigkeit von der Kulturdauer

Dargestellt sind die Mittelwerte zweier Wachstumszyklen mit jeweils drei parallelen Bestimmungen. Die Kultivierung der Zellen und die Durchführung der Bestimmungen von Frisch- und Trockengewicht sind in Kapitel 2.2.7.1, 2.2.7.2 und 2.2.7.3 aufgeführt.

Während der Zeit vom Start der Kultur bis zum vierten Kulturtag zeigte das Frischgewicht nur eine geringe Zunahme von ca. 40 %. Die Zellen befanden sich in der lag-Phase. Zwischen dem vierten und sechsten Kulturtag erfolgte ein gleichmäßiges, relativ langsames Wachstum, so dass sich die frische Zellmasse am 6. Tag verdoppelt hatte. In der Phase vom 6. bis 18. Tag stieg die Zellmasse stark an. Diese Phase war durch ein schnelles Wachstum gekennzeichnet und entsprach dem im Modell als linear bezeichneten Bereich.

Anschließend verlangsamte sich das Wachstum und es begann der Übergang in die stationäre Phase, die aber bis zum Ende des 20. Tages nicht erreicht wurde.

Ein Vergleich von Frisch- und Trockengewicht zeigte zunächst einen parallelen Verlauf der Kurven, der bis zum 8. Tag anhielt. Mit Beginn des 8. Tages stieg das Trockengewicht deutlich langsamer als das Frischgewicht, so dass sich die

beiden Kurven immer weiter voneinander entfernten. Dies bedeutet, dass die Frischgewichtszunahme nicht ausschließlich auf eine vermehrte Zellzahl zurückzuführen war, sondern, dass der Wassergehalt in den Zellen zunahm. Dies muss darauf zurückgeführt werden, dass der Grad der Vakuolisierung anstieg.

3.2.4.1.2 Änderungen der Leitfähigkeit und der Saccharosekonzentration im Wachstumsverlauf der Zellsuspensionskultur

Neben der Zunahme von Frisch- und Trockengewicht während des Wachstumszyklus lassen auch die Änderungen des Saccharosegehaltes und der Leitfähigkeit des Nährmediums eine Beschreibung des Wachstumsverhalten einer Zellsuspensionskultur zu.

Die Leitfähigkeit ist proportional der Ionenkonzentration im Medium, deren Hauptanteil die Nitrat- und Ammoniumionen darstellen. Durch die Messung der Leitfähigkeit kann daher der durch Wachstum verursachte Verbrauch der Stickstoffquelle beschrieben werden.

Das Standardmedium der untersuchten Zellkulturen enthielt als einzige Kohlenstoffquelle Saccharose, so dass die Veränderung der Saccharosekonzentration während des Wachstumszyklus den Verbrauch von Kohlenstoff anzeigt und somit auf die Aktivität des Energie- und Baustoffwechsels geschlossen werden kann.

In den Abbildungen 13 und 14 sind die Änderungen der Leitfähigkeit und der Saccharosekonzentration im Medium während des Wachstumsverlaufs dargestellt.

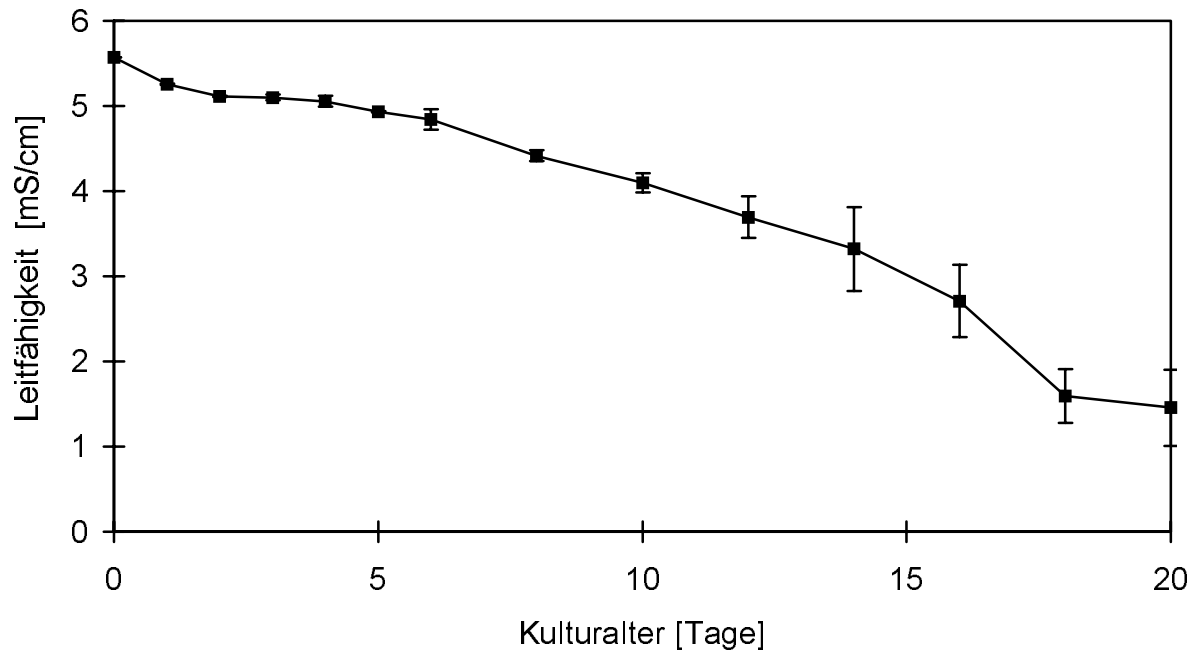


Abbildung 13: Leitfähigkeit des Kulturmediums der Zellsuspension in Abhängigkeit von der Kulturdauer

Dargestellt sind die Mittelwerte zweier Wachstumszyklen mit jeweils drei parallelen Bestimmungen. Die Kultivierung der Zellen und die Durchführung der Leitfähigkeitsbestimmung ist in Kapitel 2.2.7.1 und 2.2.7.5 dargestellt.

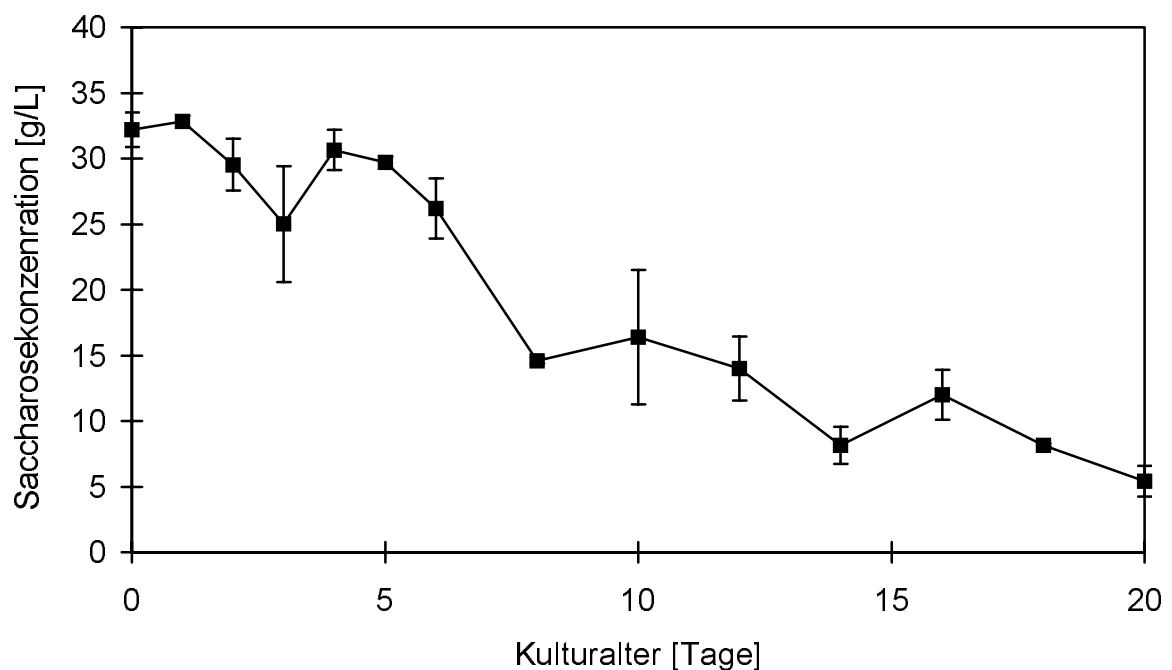


Abbildung 14: Saccharosekonzentration des Kulturmediums der Zellsuspension in Abhängigkeit von der Kulturdauer

Dargestellt sind die Mittelwerte zweier Wachstumszyklen mit jeweils drei parallelen Bestimmungen. Die Kultivierung der Zellen und die Durchführung zur Bestimmung der Saacharosekonzentration ist in Kapitel 2.2.7.1 und 2.2.7.6 erläutert.

Sowohl die Leitfähigkeit als auch die Saccharosekonzentration zeigten einen Kurververlauf, der sich gegenläufig zu der durch das Frischgewicht beschriebenen Wachstumskurve verhält.

Die Leitfähigkeit nahm bis zum sechsten Kulturtag nur sehr langsam ab, zu dieser Zeit war auch das Wachstum sehr gering. Nach dem sechsten Tag wurden - offensichtlich auf Grund des starken Wachstums - in hohem Maße Ionen von den Zellen aufgenommen und verbraucht. Dadurch sank die Ionenkonzentration bis zum 18. Tag linear. Darauf folgte eine nur noch sehr geringe Abnahme der Leitfähigkeit, die ähnlich wie die Änderungen des pH-Werts einen Übergang zur stationären Phase anzeigte (siehe Kapitel 3.2.4.1.3).

Der Änderung der Saccharosekonzentration während des Wachstumszyklus ähnelte den Leitfähigkeitsänderungen. Auch diese zeigte bis zum 6. Tag nur einen langsamen Verbrauch von Zucker, der sich dann bis zum 18. Tag erheblich verstärkte und abschließend nahezu unverändert blieb. Die Verläufe beider Kurven sind fast identisch. So sinkt die Leitfähigkeit zwischen dem 6. und 18. Tag von 87 % auf 29 % und die Saccharosekonzentrationen von 81 % auf 25 %. Die Messungen der Nährstoffe im Medium ergeben somit das gleiche Bild vom Wachstumszyklus der Kulturen wie die Bestimmung des Frischgewichtes.

3.2.4.1.3 Änderungen des pH-Wertes im Wachstumsverlauf der Zellsuspensionskultur

Zur weiteren Beschreibung und Charakterisierung der Zellsuspensionskultur wurde der Verlauf des pH-Wertes im filtrierten Medium während der Kulturdauer ermittelt. Die pH-Wert-Änderung zeigt ob von der Kultur pH-Wert beeinflussende Substanzen in das Medium abgegeben werden. Daraus kann ersehen werden, dass zum Beispiel zu Beginn des Wachstumszyklus starke Stoffwechselleistungen erfolgen, die durch das Frisch- oder Trockengewicht nicht erfasst werden. Eine Stagnation des pH-Wertes zum Ende des Wachstumszyklus zeigt, dass nur noch geringe Stoffwechselleistungen erfolgen.

Die Veränderungen des pH-Wertes während des Wachstumszyklus ist in Abbildung 15 dargestellt.

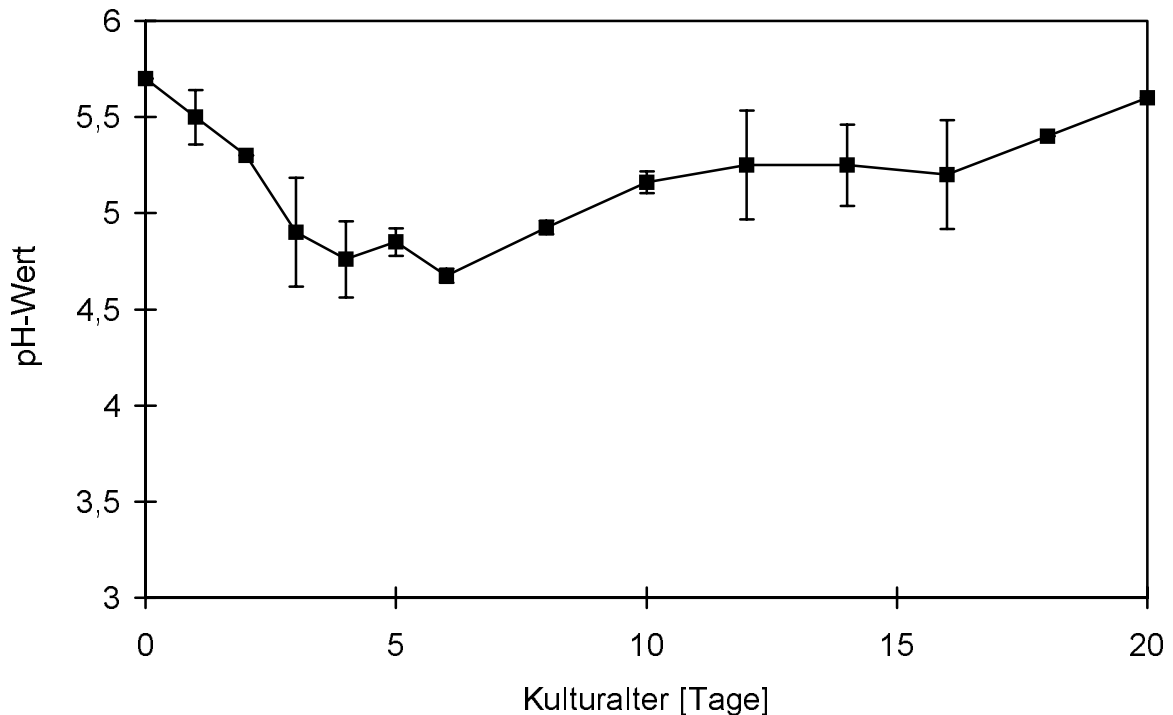


Abbildung 15: Änderung des pH-Wertes der Zellsuspension während des Wachstumszyklus

Dargestellt sind die Mittelwerte zweier Wachstumszyklen mit jeweils drei parallelen Bestimmungen. Die Kultivierung der Zellen und die Durchführung der pH-Wert Messung ist in Kapitel 2.2.7.1 und 2.2.7.4 beschrieben.

Vom Start der Kultur bis zum sechsten Tag nach der Inokulation sank der pH-Wert der Suspension von 5,6 bis auf 4,7. Dies entsprach dem Zeitraum, in dem das Frisch- und Trockengewicht stagnierte. Da die Zellen sich auf die neuen Kulturbedingungen einstellen mussten, fand während dieser Zeit zwar eine deutliche Stoffwechselleistung, aber nur ein geringes Zellwachstum statt. Vom 6. bis 14. Kulturtag stieg der pH-Wert stark an und erreichte mit 5,3 einen Wert nahe dem Anfangs-pH-Wert. Dieser pH-Anstieg erfolgte in einer Phase, in der auch die Zellmasse stark zunahm. Ab dem 14. Kulturtag erhöhte sich der pH-Wert des Mediums nur noch sehr langsam, ähnlich der Zellwachstumsrate. Dieser weitere Anstieg des pH-Wertes deutet somit ebenso darauf hin, dass die stationäre Phase noch nicht erreicht war. Die pH-Wert Veränderungen zeigen noch empfindlicher als das Frischgewicht, dass die Zellen auch während der lag-Phase einen intensiven Stoffwechsel betreiben und Substanzen ausscheiden.

Die pH-Wert Änderung während des Wachstumszyklus wies damit große Ähnlichkeit zu dem Kurvenverlauf des Frischgewichtes auf und zeigte Phasen mit großer bzw. geringer Stoffwechselaktivität an.

3.2.4.2 Charakterisierung der Flüssigkultur aus transformierten Wurzeln

Der Wachstumsverlauf der Flüssigkultur aus Wurzeln wurde über einen Zeitraum von 22 Tagen untersucht. Anders als bei der Subkultivierung dieser Kultur wurde während des gesamten Beobachtungszeitraumes kein neues Medium zugesetzt.

Um das Wachstumsverhalten dieser Flüssigkultur zu beschreiben, wurde das Frisch- und ihr Trockengewicht der Kultur sowie der pH-Wert, die Leitfähigkeit und der Saccharosegehalt im Kulturmedium bestimmt.

3.2.4.2.1 Frisch- und Trockengewicht einer Wurzelflüssigkultur aus

Linum usitatissimum

Der Wachstumsverlauf der Flüssigkultur aus Wurzeln wurde gleichermaßen über das Frisch- und Trockengewicht beschrieben. Frisch- und Trockengewicht sind ein Maß für das Zellwachstum.

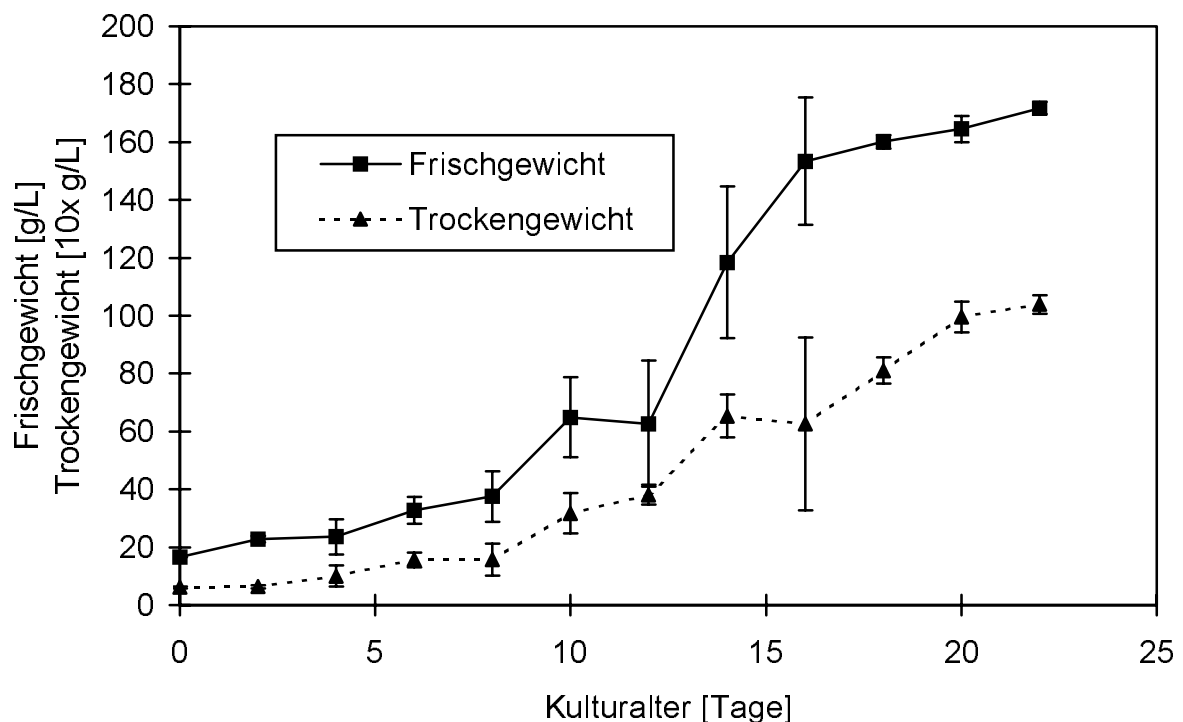


Abbildung 16: Frisch- und Trockengewicht der Wurzelflüssigkultur in Abhängigkeit von der Kulturdauer

Dargestellt sind die Mittelwerte dreier Wachstumszyklen mit jeweils drei parallelen Bestimmungen. Die Kultivierung der Wurzeln und die Durchführung der Bestimmungen von Frisch- und Trockengewicht sind in Kapitel 2.2.7.1 und 2.2.7.2 dargestellt.

Das Wachstum der Wurzeln war ebenfalls wie das der Zellsuspension in den ersten vier Kulturtagen sehr gering (1,8 g/L proTag). Die Flüssigkultur befand sich

in der lag-Phase. In den darauffolgenden vier Tagen gingen die Wurzeln in die Phase exponentiellen Wachstums über und verdoppelten während dieser Zeit ihr Frischgewicht.

Vom 8. bis 16. Tag stieg das Frischgewicht nahezu linear an. Diese Phase war durch ein schnelles Wachstum gekennzeichnet und entspricht der im Modell als linear bezeichneten Bereich. Am Ende dieser Phase hatte sich das Frischgewicht verzehnfacht.

Anschließend verlangsamte sich das Wachstum auf eine Frischgewichtszunahme von 2 % pro Tag. Auch nach 22 Tagen war die stationäre Phase noch nicht erreicht und die Wurzeln zeigten immer noch ein langsames Wachstum.

Der Kurvenverlauf des Trockengewichtes verlief bis zum 10. Tag parallel zu der des Frischgewichtes, dann jedoch stieg das Trockengewicht deutlich langsamer und die beiden Kurven entfernten sich immer weiter voneinander.

Dabei wurde in den Wurzeln keine so große Wasserzunahme wie in den Zellen der Zellsuspension erreicht. Hieraus kann gefolgert werden, dass auch ein geringer Vakuolisierungsgrad vorlag.

3.2.4.2.2 Leitfähigkeit und Saccharosekonzentration im Verlauf des Wachstums einer Wurzelflüssigkultur

Die Veränderungen des Saccharosegehaltes und der Leitfähigkeit des Nährmediums in Abhängigkeit von der Kulturdauer sind für die Flüssigkultur aus Wurzeln in den Abbildungen 17 und 18 dargestellt.

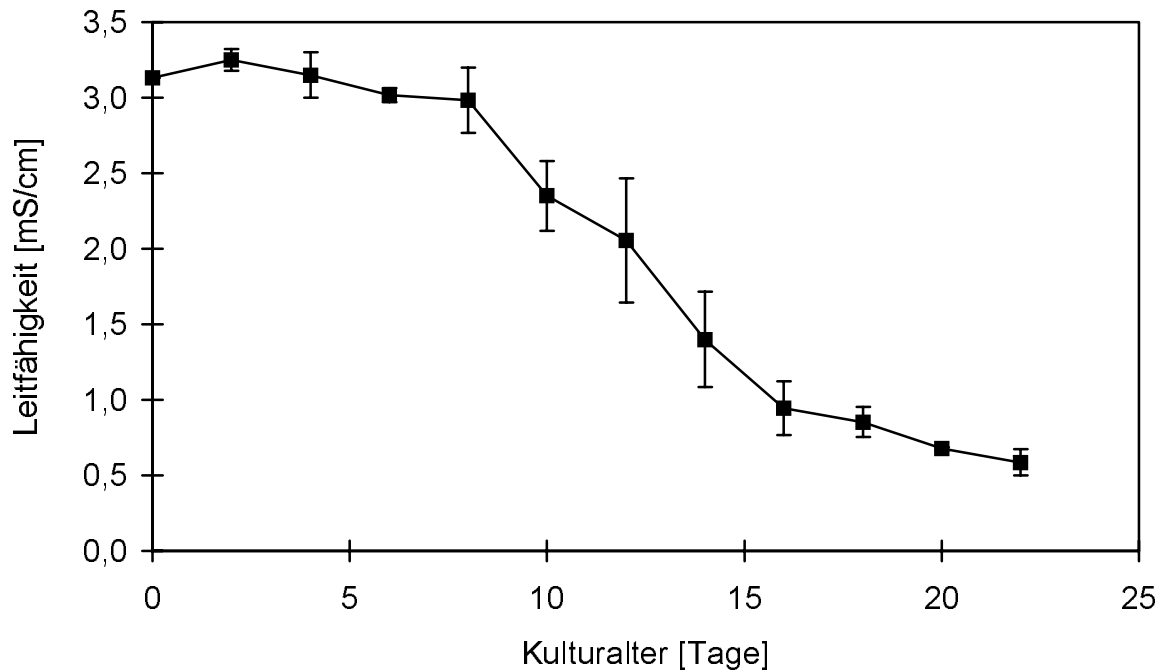


Abbildung 17: Leitfähigkeit des Kulturmediums der Wurzelflüssigkultur in Abhängigkeit von der Kulturdauer

Dargestellt sind die Mittelwerte dreier Wachstumszyklen mit jeweils drei parallelen Bestimmungen. Die Kultivierung der Wurzeln und die Bestimmung der Leitfähigkeit sind in Kapitel 2.2.7.1 und 2.2.7.5 beschrieben.

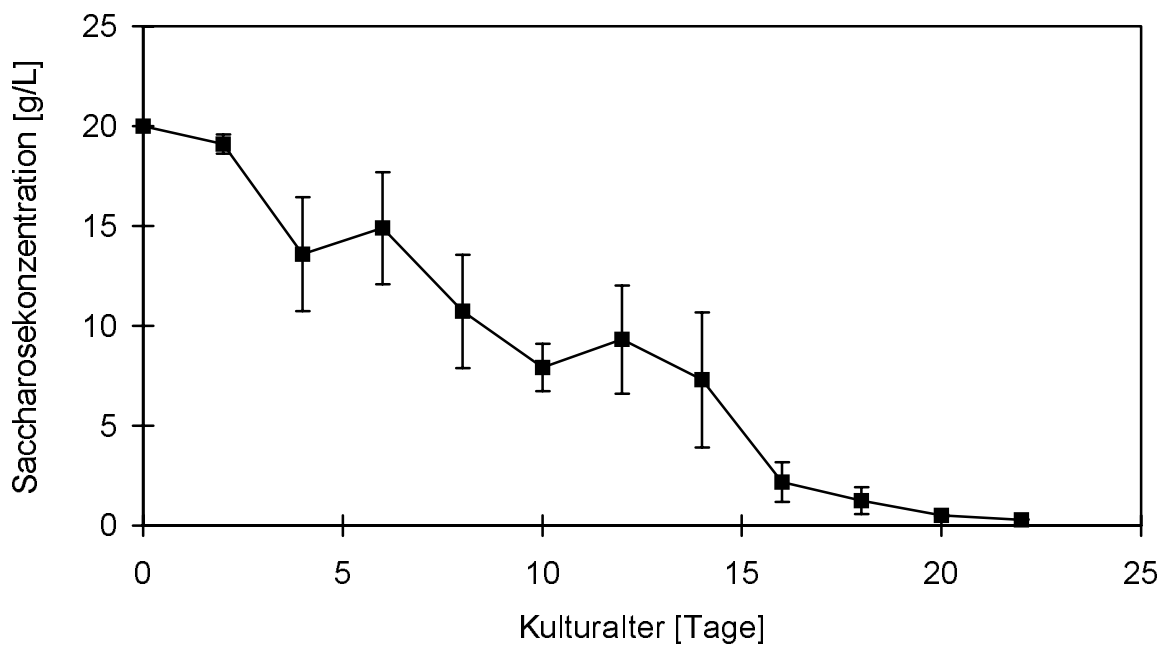


Abbildung 18: Saccharosekonzentration des Kulturmediums der Wurzelflüssigkultur in Abhängigkeit von der Kulturdauer

Dargestellt sind die Mittelwerte dreier Wachstumszyklen mit jeweils drei parallelen Bestimmungen. Die Kultivierung der Wurzeln und die Bestimmungen der Saccharosekonzentration sind in Kapitel 2.2.7.1 und 2.2.7.6 beschrieben.

Die durch das Wachstum bedingte Aufnahme von Saccharose und Ionen aus dem Nährmedium in die Wurzelzellen führte zu einer starken Abnahme der Konzentration von Zucker und Ionen. Dabei verhielt sich die Abnahme dieser Nährstoffe proportional zum Wachstum und Vitalitätszustand der Wurzeln.

Die Veränderung der Leitfähigkeit im Medium verlief genau entgegengesetzt zur Zunahme des Frischgewichtes. Da die Kultur bis zum sechsten Tag nur langsam wuchs, wurden nur wenige Ionen in die Wurzeln aufgenommen und infolgedessen nahm die Leitfähigkeit in dieser Zeit nur um 3 % ab. Nach dem sechsten Tag wurden Ionen auf Grund des starken Wachstums in hohem Maße verbraucht, und die Ionenkonzentration sank um weitere 67 % bis zum 18. Tag ab. Danach verringerte sich die Leitfähigkeit nur noch sehr wenig (10 %), dies zeigte den Beginn der stationären Phase an.

Die Saccharosekonzentration nahm im Vergleich mit der Leitfähigkeit während des Wachstumszyklus deutlich schneller ab. Obwohl in den ersten vier Tagen nur eine geringe Veränderung des Frischgewichtes festgestellt wurde, sank die Saccharosekonzentration bereits um 20 %. In der darauffolgenden Phase linearen Wachstums wurden große Mengen Saccharose verbraucht, so dass am Ende dieser Phase nur noch 10 % Saccharose zur Verfügung stand. Nach dem 16. Kulturtag verlangsamte sich daher das Wachstum der Wurzeln immer weiter bis am Ende des Beobachtungszeitraumes nahezu die gesamte Saccharose verbraucht war (98,5 %). Die Wurzelkultur stand auf Grund des Saccharosemangels nach 16 Tagen kurz vor der Phase des stationären Wachstums. Daher wurde bei der Stammhaltung der Flüssigkultur nach 14 Tagen neues Medium zugegeben und nach weiteren sieben Tagen die Wurzelmasse passagiert.

3.2.4.2.3 Änderungen des pH-Wertes im Wachstumsverlauf der Wurzelflüssigkultur

Zur Beschreibung und Charakterisierung der Wurzelflüssigkultur wurde auch der Verlauf des pH-Wertes des filtrierten Mediums während der Kulturdauer ermittelt. Die Veränderungen des pH-Wertes über den Verlauf des Wachstumzyklus ist in Abbildung 19 dargestellt.

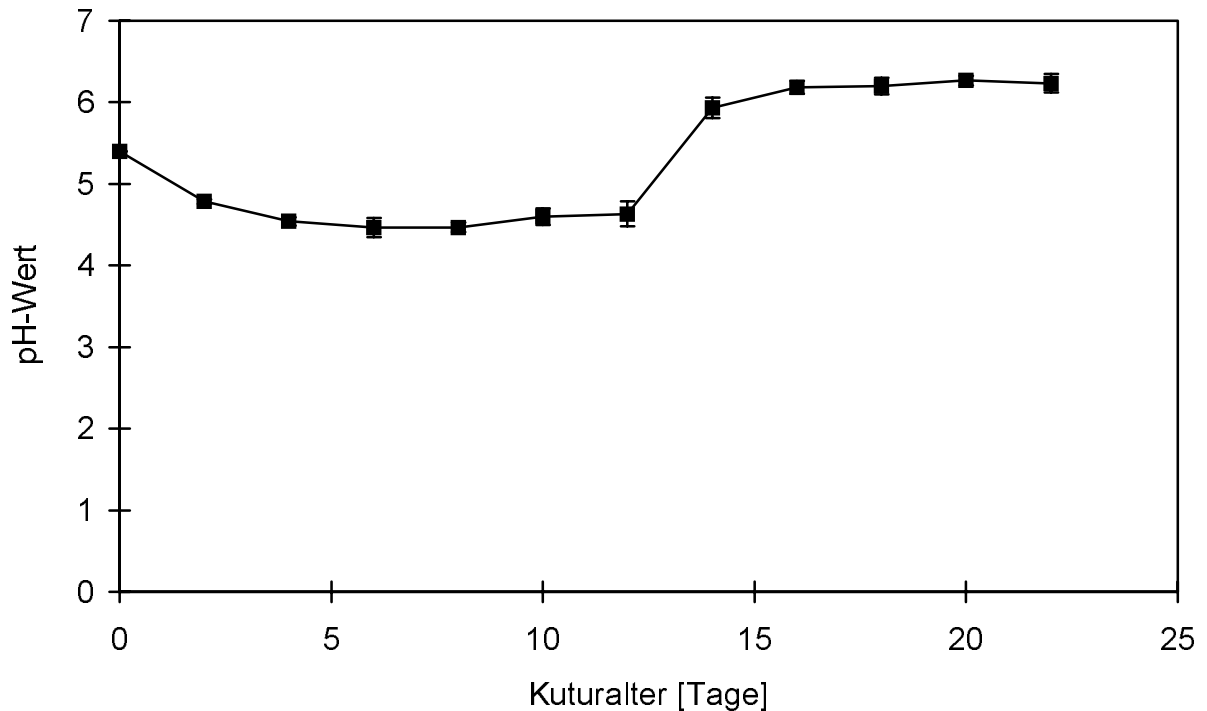


Abbildung 19: Änderung des pH-Wertes im Verlauf des Wachstumszyklus der Wurzelflüssigkultur

Dargestellt sind die Mittelwerte dreier Wachstumszyklen mit jeweils drei parallelen Bestimmungen. Die Kultivierung der Wurzeln und die Durchführung der Bestimmungen von Frisch- und Trockengewicht sind in Kapitel 2.2.7.1 und 2.2.7.2 beschrieben.

Innerhalb der ersten vier Kulturtage sank der pH-Wert des Mediums von 5,4 (nach dem Autoklavieren) auf 4,5 ab. Diese pH-Wert-Änderung beruht auf einer starken Stoffwechselleistung der Wurzeln in Folge der Anpassung an die Inokulationsbedingungen. Ein Wurzelwachstum ist während dieser Zeit allerdings noch nicht zu beobachten. An den darauffolgenden Kulturtagen veränderte sich der pH-Wert nicht, es kam erst am 12. Tag nach der Inokulation zu einem steilen Anstieg des pH-Wertes auf 6,3. Dieser pH-Anstieg zwischen dem 12. und 16. Kulturtag erfolgte in einer Phase, in der auch die Zellmasse stark zunahm. An den weiteren Kulturtagen wurde keine pH-Wert-Änderung festgestellt, was ebenfalls auf den Beginn einer stationären Phase hindeutete.

3.2.5 Gehalt cyanogener Verbindungen in *Linum* (HCN-Potenzial)

Das Blausäurepotenzial einer Probe (z.B. Pflanze, Zellkultur) wird definiert als die Summe aller Verbindungen in dieser Probe, aus denen durch enzymatischen Abbau potentiell Cyanid freisetzbar ist.

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Samen der Leinpflanze (*Linum usitatissimum*) große Mengen cyanogener Glycoside akkumulieren und somit ein hohes Blausäurepotenzial aufweisen (FAN & CONN, 1985; BAHN 1992, SAGASSER, 1996). Über das HCN-Potenzial in den einzelnen vegetativen Organen der Leinpflanze lagen jedoch keine Informationen vor. Daher wurden zunächst einzelne Organe der Leinpflanze, wie Spross, Blatt und Wurzel, auf das Blausäurepotenzial untersucht. Mit diesen Daten kann die Verteilung cyanogener Glycoside in stark cyanogenen Pflanzen zwischen der generativen und vegetativen Organe verglichen werden. Desweiteren dienten diese Untersuchungen als Basis für einen Vergleich der Blausäurepotenziale mit denen in dieser Arbeit etablierten Zell- und Gewebekulturen.

Produkte des Sekundärstoffwechsels, wie die cyanogenen Glycoside, die von intakten Pflanzen synthetisiert und akkumuliert werden, konnten in Zellkulturen häufig nur in geringen Mengen oder gar nicht nachgewiesen werden.

Die Untersuchung des Gehaltes cyanogener Glucoside in Zell- und die Wurzelkulturen von *Linum usitatissimum* sollten klären, welche Mengen der Sekundärstoffe in diesen Kulturen akkumuliert werden. Die Zell- und Wurzelkulturen von *Linum usitatissimum*, die nur geringe Mengen cyanogener Glucoside enthalten, sind besonders gut für Untersuchungen zur Aufnahme von Cyanglucosiden geeignet, da leicht zwischen den aufgenommenen und endogenen Glucosiden unterschieden und bilanziert werden kann.

Zusätzlich wurde das Blausäurepotenzial weiterer Zellkulturen anderer Leinvarietäten bestimmt.

3.2.5.1 Optimierung der Methode zur Bestimmung des HCN-Potenzials

Bei verletzungsbedingter Cyanogenese wird aufgrund enzymatischer Hydrolyse der cyanogenen Glycoside Blausäure freigesetzt. Eine Bestimmung des HCN-Potenzials kann deshalb über die quantitative Analyse der Blausäure erfolgen, die nach enzymatischer Spaltung durch β -Glucosidasen freigesetzt wird. Dazu muss gewährleistet sein, dass alle cyanogenen Glycoside aus dem Gewebe extrahiert und vollständig im Inkubationsansatz hydrolysiert wurden, und die gebildeten Hydroxynitrile restlos zerfallen. Der Zerfall der Hydroxynitrile wurde durch die Alkalisierung des Inkubationsansatzes nach erfolgter enzymatischer Spaltung

sichergestellt (SELMAR, 1986). Allerdings muß zu Beginn jeder neuen Versuchsreihe nachgewiesen werden, dass sämtliche cyanogenen Glycoside aus dem Probenmaterial extrahiert und durch die eingesetzten Enzyme quantitativ umgesetzt wurden.

Methanolische Extraktion

Die Extraktion der cyanogenen Glycoside erfolgte mit Methanol nach der in Kapitel 2.2.7.8.1 beschriebenen Methode. Diese Methode wurde in Anlehnung an ein von Bahn (1992) und Sagasser (1996) angewandtes Verfahren entwickelt. Dabei wurde das gefriergetrocknete Pflanzenmaterial im Mörser mechanisch aufgeschlossen und die Zellen durch Ultraschall aufgebrochen. Durch das methanolische Milieu der Extraktion wurden die cyanogenen Glycoside im Methanol gelöst und gleichzeitig die hydrolytischen Enzyme, die im Pflanzenmaterial enthalten sind, denaturiert. Somit wurde eine Spaltung der cyanogenen Glycoside im Zuge der Dekompartimentierung verhindert.

Nach erfolgter methanolischer Extraktion wurden die Sedimente noch zwei weitere Male mit Methanol gewaschen. Die getrennte Untersuchung dieser Waschlösungen auf ihren Blausäuregehalt zeigte, dass im zweiten Waschgang kaum noch cyanogenen Glycoside enthalten waren. Dies bewies, dass mit dieser Methode die cyanogenen Glycoside vollständig aus dem Pflanzenmaterial extrahiert wurden und damit die Methode geeignet ist.

Enzyme

Nach Bahn (1992) enthalten die Samen von *Linum usitatissimum* sowohl cyanogene Monoglucoside (Linamarin und Lotaustralin) als auch Diglucoside (Linustatin und Neolinustatin). Dies musste bei der Auswahl der hydrolytischen Enzyme berücksichtigt werden.

Als Enzympräparat wurde daher ein Gemisch bestehend aus einer β -Glucosidase aus *Hevea brasiliensis* und aus Emulsin (Firma Fluka) eingesetzt.

Die β -Glucosidase aus *Hevea brasiliensis* spaltet nur Monoglucoside wie Linamarin oder Lotaustralin, jedoch nicht die Diglucoside Linustatin und Neolinustatin (SELMAR et al., 1987). Sie wurde als partiell gereinigte Enzymfraktion (Gelfiltration, G150) eingesetzt. Bei dem zugesetzten Emulsin, handelt es sich um

ein β -Glucosidasegemisch aus Mandeln, das sowohl aromatische Monoglucoside als auch aromatische und aliphatische Diglucoside hydrolysiert (HÖSEL, 1981).

Um zu prüfen, ob die eingesetzte Enzymlösung die cyanogenen Glycoside der Probe vollständig hydrolysiert, wurde dem optimierten Standardinkubationsansatz eine definierte Menge an Linamarin und Linustatin, die ungefähr zehnfach über den Gehalten in den Proben lag, zugesetzt. Die vollständige Spaltung dieser Cyanglucoside bewies eine ausreichende Enzymaktivität bei den gewählten Inkubationsbedingungen (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Gehalte cyanogener Glycoside in einer Probe aus Blättern und in einer Additionsanalyse

Der methanolische Extrakt eines Leinblattes wurde zur Trockne eingedampft, in Mc Ilvaine-Puffer resuspendiert. Wie in Kapitel 2.2.7.8 beschrieben, wurde der Gehalt cyanogener Glucoside bestimmt. Ein Aliquot dieses Extraktes wurde mit 1 μmol Linamarin und 1 μmol Linustatin versetzt und erneut wurde der Gehalt cyanogener Glucoside nach den Standardverfahren bestimmt. Eingesetzt wurden 100 μL Enzymgemisch aus β -Glucosidase und Emulsin (s. Kapitel 2.2.7.9.2)

| Probe | Gehalt cyanogener Glucoside in der Probe | Gehalt cyanogener Glucoside zugesetzt | Gehalt cyanogener Glucoside nachgewiesen |
|---------|--|---|--|
| Blätter | 0,12 μmol | 1 μmol Linamarin und 1 μmol Linustatin | 2,11 μmol |

Inkubationsbedingungen

Um während des enzymatischen Abbaus der cyanogenen Glycoside Verluste durch freiwerdende Blausäure zu vermeiden, erfolgte die Inkubation der Pflanzenorgan-Extrakte im Thunberg-Gefäß. Die gesamte freiwerdende Blausäure konnte auf diese Weise in der Natronlaugevorlage aufgefangen werden. Nach der Inkubation wurde der Reaktionsansatz mit der Natronlauge aus der Seitenbirne alkalisiert und die Reaktion dadurch abgestoppt. Die alkalisierte Inkubationslösung wurde direkt für den Cyanid-Test eingesetzt.

Für die Bestimmung der Gehalte cyanogener Glycosiden in Zell- und Wurzelkulturen mußte geprüft werden, ob die für die Pflanzenextrakte verwendete Inkubationsmethode auch für diese Proben geeignet war. Da es sich bei den methanolischen Extrakten der transformierten Wurzeln und der Zellkulturen um

sehr stark konzentrierte Extrakte handelt, wurde angenommen dass auch Inhaltstoffe - wie Zucker -, welche die enzymatische Spaltung oder den Cyanid-Test beeinflussen können, in hoher Konzentration auftreten und eine Störung der Nachweisreaktion bewirken können. Daher wurde sowohl eine Bestimmung nach der gleichen Methode wie die der Blatt-, Spross- und Wurzelgewebe durchgeführt, als auch eine modifizierte Inkubation angewendet. Für die modifizierte Inkubation wurde einer Zellkulturprobe während der Extraktion Linamarin (25 nmol) zugesetzt. Mit dieser Methode wurde weder in der Zell- noch in den Wurzelkulturen Cyanid nachgewiesen, noch konnte das zugesetzte Linamarin detektiert werden.

Mögliche Ursachen für dieses Ergebnis stellten sowohl eine Störung des Cyanid-Testes als auch eine Störung der enzymatischen Hydrolyse während der Inkubation dar. Um zu klären, an welchem Reaktionsschritt eine Störung auftritt, wurde in einem Testansatz dem Extrakt zunächst eine KCN-Lösung (50 nmol) zugesetzt. Der Cyanid-Test fiel für diesen Extrakt ebenfalls negativ aus, was auf eine Störung der Nachweisreaktion des Cyanid-Testes schließen läßt.

Es musste also gewährleistet sein, dass die freigesetzte Blausäure nicht in der gleichen Lösung vorlag wie die methanolisch extrahierten Störsubstanzen. Der enzymatische Abbau eines Extraktes erfolgte daraufhin in Warburg-Gefäßen (siehe Kapitel 2.2.7.8.2), so dass eine Beeinträchtigung durch diese Substanzen ausgeschaltet wurde. Diesem Extrakt wurde ebenfalls als Kontrolle Linamarin (25 nmol) zugegeben. Anschließend wurde der methanolische Extrakt bis zur Trockne im Luftstrom eingengt und mit Mc Ilvaine-Puffer (pH 5,6) resuspendiert. Der resultierende wässrige Extrakt wurde in den äußeren Bereich des Warburg-Gefäßes gegeben und mit dem Enzymgemisch (siehe Kapitel 2.2.7.8.2 *Enzyme*) versetzt, während das Rundgefäß im Innenraum als Natronlaugenvorlage fungierte. Nach der erfolgten Inkubation wurde das Inkubat durch Zupipettieren weiterer Natronlauge alkalisiert, um einen vollständigen Zerfall der gebildeten Cyanhydrine zu erreichen. Anschließend wurde der äußere Bereich des Gefäßes mit Salzsäure angesäuert und somit die Blausäure aus der Lösung ausgetrieben und in die Natronlaugenvorlage überführt. Ein Aliquot dieser Natronlaugevorlage, die zwar die gesamte freigesetzte Blausäure enthielt, aber keine Störsubstanzen, wurde für den Cyanid-Test eingesetzt.

Eine Wiederfindungsrate von 97 % des zugesetzten Linamarins zeigte, dass mit diesem Verfahren die cyanogenen Glycoside quantitativ nachgewiesen werden konnten.

3.2.5.2 Blausäurepotenzial der Organe von *Linum usitatissimum*

Leinpflanzen (*Linum usitatissimum*) gehören zur Gruppe der stark cyanogenen Pflanzen (BUTLER, 1965; SMITH et al., 1980; SCHILCHER & WILKENS-SAUTER, 1986). Im Gegensatz zu vielen anderen Pflanzen werden in Leinsamen zum größten Teil die cyanogenen Diglucoside Linunstatin und Neolinustatin akkumuliert, wohingegen die Monoglucoside Linamarin und Lotaustralin nur in kleinen Mengen nachgewiesen wurden. Bahn (1992) konnte zeigen, dass in Leinsamen aber auch geringe Konzentrationen weiterer nicht beschriebener Glucoside vorkommen. Da nur wenige Daten über das Blausäurepotenzial in den vegetativen Organen der Leinpflanzen vorlagen (NIEDZWIEDZ-SIEGIEN, 1997), wurden in dieser Arbeit alle Organe der Leinpflanze auf das Vorhandensein von Blausäure freisetzenden Verbindungen untersucht (siehe Abbildung 20).



Abbildung 20: Blausäurepotenzial in den Organen von Leinpflanzen

Dargestellt ist die Summe der cyanogenen Verbindungen, die enzymatisch als Blausäurepotenzial bestimmt wurden. Die cyanogenen Glucoside wurden methanolisch aus den Organen extrahiert, bis zur Trockne eingedampft, anschließend in Mc Ilvaine-Puffer pH 5,6 resuspendiert und nach enzymatischer Spaltung mit Hilfe des Cyanidtestes quantifiziert (siehe Kapitel 2.2.7.9). Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von fünf getrennten Bestimmungen.

In allen vier Organen der Leinpflanze (Wurzel, Blätter, Spross und Samen) sind große Mengen cyanogener Glycoside nachweisbar (Abbildung 20). Allerdings ist das Blausäurepotenzial der einzelnen Organe sehr unterschiedlich. Die höchsten Konzentration an cyanogenen Glucosiden befand sich in den generativen Organen der Pflanze, den Samen, die 320 $\mu\text{mol/g}$ Trockengewicht freisetzbare Blausäure enthielten.

Die Wurzeln und der Spross von *Linum usitatissimum* wiesen mit 24 $\mu\text{mol/g}$ TG und 27 $\mu\text{mol/g}$ TG nahezu ein identisches HCN-Potential auf, wohingegen das Blausäurepotenzial in den assimilatorisch aktiven Geweben, den Blättern, doppelt so hoch ist (60 $\mu\text{mol/g}$ TG).

3.2.5.3 Blausäurepotenzial von Zell- und Gewebekulturen verschiedener Leinvarietäten

Während viele Daten über das Vorkommen von cyanogenen Glycosiden in intakten Pflanzen vorliegen, gibt es nur wenige Informationen zum Vorkommen dieser Sekundärstoffe in Zellkulturen. Von vielen anderen Sekundärstoffen ist bekannt, dass sie zwar in den intakten Pflanzen synthetisiert und akkumuliert werden, häufig waren sie jedoch nicht in den Zell- und Gewebekulturen dieser Pflanzen nachzuweisen.

Um zu prüfen, ob Zell- und Wurzelkulturen von Lein cyanogene Glucoside enthalten, wurde in mehreren Zellkulturen, die aus unterschiedlichen Leinvarietäten etabliert wurden, das Blausäurepotenzial bestimmt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 21 dargestellt.

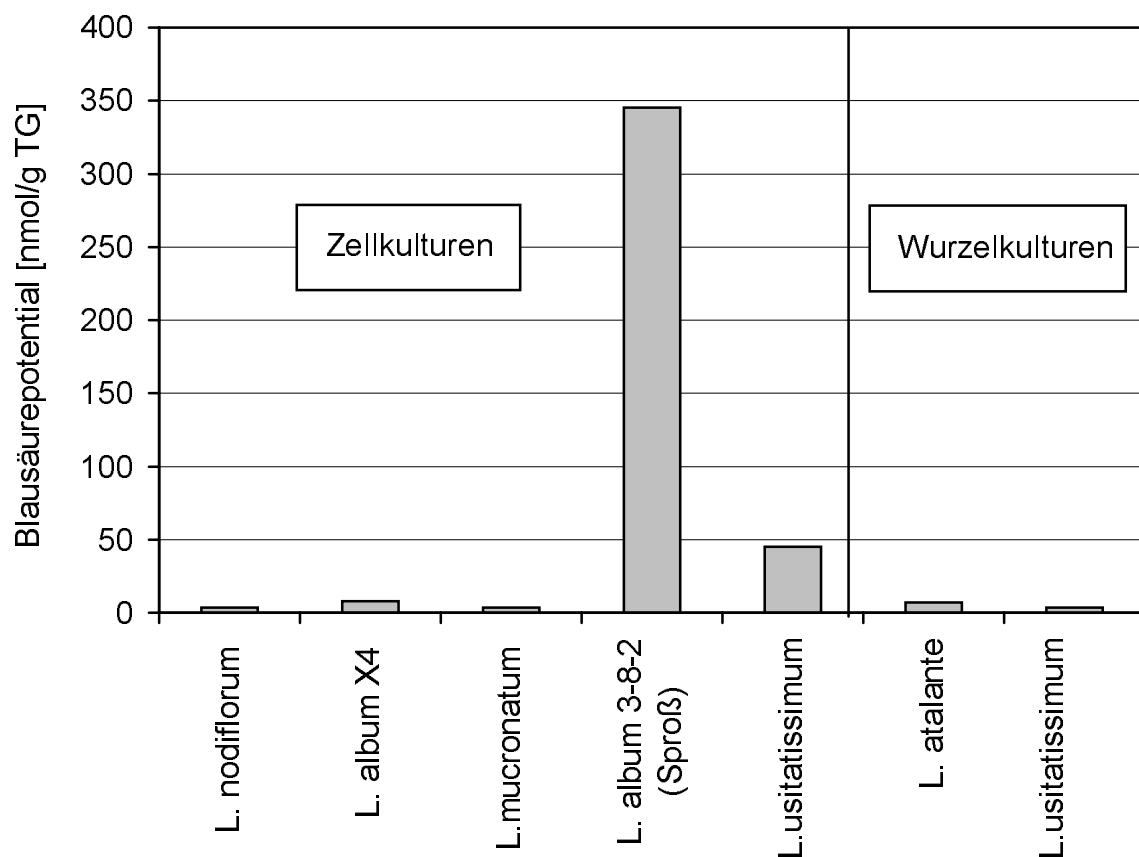


Abbildung 21: Blausäurepotenzial in verschiedenen Zell- und Wurzelkulturen unterschiedlicher Leinvarietäten

Dargestellt ist die Summe der cyanogenen Verbindungen, die enzymatisch als Blausäurepotenzial bestimmt wurden (siehe Kapitel 2.2.7.9).

Die Zellkulturen *L. nodiflorum*, *L. album* X4, *L. mucronatum* und *L. album* 3-8-2 wurden als gefrietrocknetes Zellmaterial von Herrn Prof. Alfermann (Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellt. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von fünf getrennten Bestimmungen.

Alle untersuchten Zellsuspensionskulturen enthalten cyanogene Glycoside (Abbildung 21). Bis auf die Zelllinie *L. usitatissimum* und *L. album*, konnten nur geringe Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Zellsuspensionskulturen festgestellt werden. Die HCN-Potenziale lagen zwischen 3 und 8 nmol/g TG. Damit lagen die Blausäurepotenziale der Zellkulturen um etwa drei Zehnerpotenzen niedriger als das der Leinwurzeln. Im Vergleich zu den Zellkulturen besaßen die stark cyanogenen Leinsamen sogar ein 100.000 fach so hohes Blausäurepotenzial.

Die in dieser Arbeit etablierte Zellsuspension von *Linum usitatissimum* enthielt ein zehnfach höheres Blausäurepotenzial als die übrigen getesteten *Linum* Zelllinien,

lediglich die aus *L. album* etablierte Kultur enthielt mit 345 nmol/g TG cyanogenen Glycosiden ein hundertfach höheres Blausäurepotenzial als die übrigen Zelllinien. Bei dieser Zellkultur handelt es sich um eine Kultur mit organogenem Charakter. Auf Grund dieser Beschaffenheit steht sie zwischen Organkulturen bzw. einer intakten Pflanze mit ausdifferenzierten Geweben und einer Einzelzellkultur.

Die geringen Gehalte cyanogener Glycoside in Zell- und Wurzelkulturen aus Lein bestätigten damit die von Berlin (1988) getroffene Aussage: „Die Sekundärstoffproduktion in einer etablierten Zellsuspensionskultur geht in der Regel im Vergleich zur intakten Pflanze stark zurück, selbst wenn die Kultur aus Geweben initiiert wurde, die einen hohen Sekundärstoffgehalt aufwiesen.“

Auch das Blausäurepotenzial der Zellkultur von *L. album* lag weit unter den Konzentrationen cyanogener Glycoside in Leinpflanzen und unterstützt damit diese Feststellung. Die hundertfach höhere Konzentration im Vergleich zu den übrigen Zellkulturen zeigte allerdings auch, dass die Synthese und Akkumulation sekundärer Pflanzenstoffe häufig an die morphologische und anatomische Differenzierungen der Gewebe gebunden zu sein scheinen (WIERMANN, 1981).

3.2.5.4 Blausäurepotenzial der Zellsuspensionskultur von *Linum usitatissimum* im Verlauf eines Wachstumszyklus

Die in den Versuchen des Kapitels 3.2.5.3 eingesetzten Zellen der Linie *Linum usitatissimum* wurden, wie alle anderen Zelllinien, von Zellen zu Beginn der stationären Wachstumsphase entnommen. Da die Ergebnisse zum Wachstum der Kultur gezeigt haben (Kapitel 3.2.4.1), dass sie in der Zeit einer Kulturdauer einem Wachstumszyklus folgen, konnte davon ausgegangen werden, dass währenddessen auch unterschiedliche Stoffwechselaktivitäten ablaufen. Diese Veränderung der Stoffwechselaktivitäten betrifft nicht nur den Primär- sondern auch den Sekundärstoffwechsel. Die oben dargestellten Blausäurepotenziale geben daher keine Auskunft über Gehaltsveränderungen cyanogener Glycoside während der gesamten Kulturdauer.

Die etablierten Zellsuspensionskulturen sollten für Untersuchungen zur Aufnahme des cyanogenen Diglucosides Linustatin eingesetzt werden. Für diese Untersuchungen war es notwendig, die genauen Blausäurepotenziale im Verlauf des Kulturwachstums zu kennen, um zwischen endogenen und aufgenommenen

cyanogenen Glycosiden sicher bilanzieren zu können. Außerdem musste die Frage geklärt werden, welche Wachstumsphase am besten für die Aufnahmestudien geeignet war. Daher wurde das Blausäurepotenzial der Zellsuspensionskultur im Wachstumsverlauf bestimmt (siehe Abbildung 22).

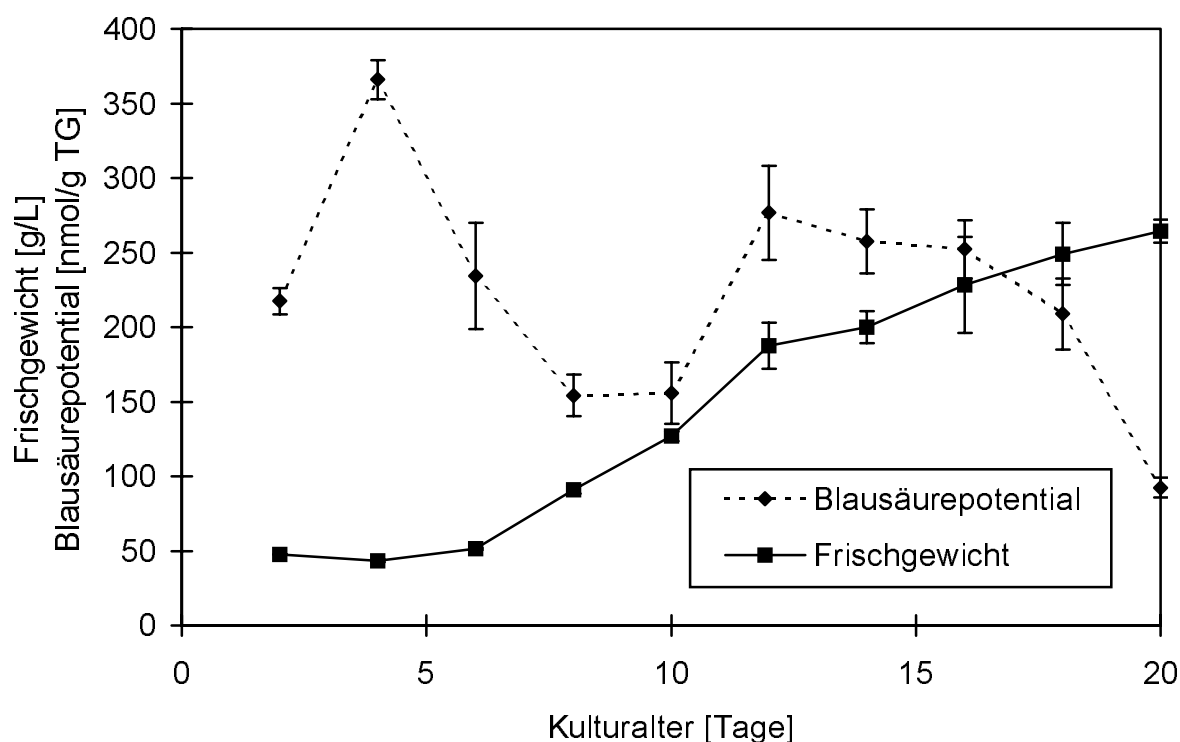


Abbildung 22: Blausäurepotenzial und Frischgewicht der Zellsuspensionskultur in Abhängigkeit der Kulturdauer

Dargestellt ist die Summe der cyanogenen Verbindungen, die enzymatisch als Blausäurepotenzial bestimmt wurden (siehe Kapitel 2.2.7.9). Die Kultivierung der Zellen und die Durchführung der Bestimmung des Frischgewichtes sind in Kapitel 2.2.7.1 und 2.2.7.2 aufgeführt. Abgebildet sind die Mittelwerte zweier Wachstumszyklen mit jeweils drei parallelen Bestimmungen.

Das Blausäurepotenzial der Zellen ist keine konstante Größe (Abbildung 22), sondern veränderte sich im Verlauf zwischen zwei Kulturpassagen. Die Konzentration cyanogener Glycoside schwankte dabei von 350 nmol/g TG während der lag-Phase, bis 90 nmol/g TG zum Ende der Kulturdauer, so dass die Zelllinie während der lag-Phase sogar eine Konzentration an potentiellen freisetzbarer Blausäure enthielt, die dem HCN-Potenzial der organogenen Zellkultur *L. album* entsprach (345 nmol/g TG siehe Abbildung 21) und fast viermal höher war, als die Konzentration an cyanogenen Glycosiden zum Ende der Wachstumsphase.

Mit Beginn der linearen Wachstumsphase sank die Konzentration der akkumulierten cyanogenen Glycoside und stieg kurz vor Ende der linearen Phase erst wieder an. Am Ende des Wachstumszyklus sank das Blausäurepotenzial und erreichte seinen niedrigsten Wert (92 nmol/g TG). Die Akkumulation der cyanogenen Glycoside und damit einhergehend eine starke Aktivität des Stoffwechsels cyanogener Glycoside ist bei der Zellsuspension von *Linum usitatissimum* immer mit einer geringen Zellvermehrung verbunden. Es kann angenommen werden, dass der gesamte Sekundärstoffwechsel bei geringer Zellvermehrung besonders aktiv ist. Eine Ausnahme stellt hier das Ende der Wachstumskurve dar. Untersuchungen der Zellzyklen verschiedener anderer pflanzlicher Zellkulturen zeigten ebenfalls, dass eine starke Zellvermehrung in der Regel mit einer geringen Aktivität des Sekundärstoffwechsels verbunden ist.

So trat in einigen Kulturen während der stationären Phase ein Anstieg der Sekundärstoffkonzentration auf. In der Zellsuspensionskultur von *Datura stramonium* fand zum Beispiel eine Akkumulation des Alkaloids Atropin mit Beginn der stationären Wachstumsphase statt (BUTTERWORTH-HEINEMANN, 1993). Die in Abbildung 22 dargestellten Ergebnisse sind die Voraussetzung, um bei einer Aufnahme von cyanogenen Glucosiden in die Zellen und Wurzeln der Suspensionskulturen aufgenommenes und endogene Cyanglucoside zu bilanzieren. Erst wenn bei einem Aufnahmeversuch die endogene Konzentration überschritten wurde, kann von einer Aufnahme gesprochen werden.

Die Daten zeigten außerdem, dass Zellkulturen sechs Tage nach der Inokulation gut für die Untersuchungen der Aufnahme von Linustatin geeignet sind. Da bei diesen Kulturen in den zwei darauffolgenden Tagen nicht mit einem Anstieg des Blausäurepotenzials zu rechnen ist, die Zellen aber eine starke Zellteilung zeigen und damit ein großes physiologisches „sink“ darstellen.

3.2.5.5 Blausäurepotenzial der Wurzelflüssigkultur aus *Linum usitatissimum* im Verlauf eines Wachstumszyklus

Das in den Versuchen des Kapitels 3.2.5.3 bestimmte Blausäurepotenzial der transformierten Wurzelkulturen wurde, wie das der übrigen Zelllinie auch, von Wurzeln am Ende eines Wachstumszyklus bestimmt. Da auch die Wurzeln während der Kulturdauer von drei Wochen einem Wachstumszyklus folgen,

musste auch in diesem Fall von einer Änderung des Blausäurepotenzials aufgrund von Stoffwechselaktivitäten ausgegangen werden.

Die transformierten Wurzeln wurden ebenfalls für Untersuchungen zur Aufnahme des cyanogenen Diglucosides Linustatin eingesetzt, so dass es notwendig war, die genauen Blausäurepotenziale im Verlauf des Kulturwachstums zu kennen. Nur mit diesen Daten konnte eine erfolgreiche Bilanzierung zwischen endogenen und aufgenommenen cyanogenen Glycosiden erfolgen und eine optimale Wachstumsphase für die Aufnahmestudien ausgewählt werden. Daher wurde das Blausäurepotenzial im Wachstumsverlauf der Flüssigkultur transformierter Wurzeln bestimmt (siehe Abbildung 23).

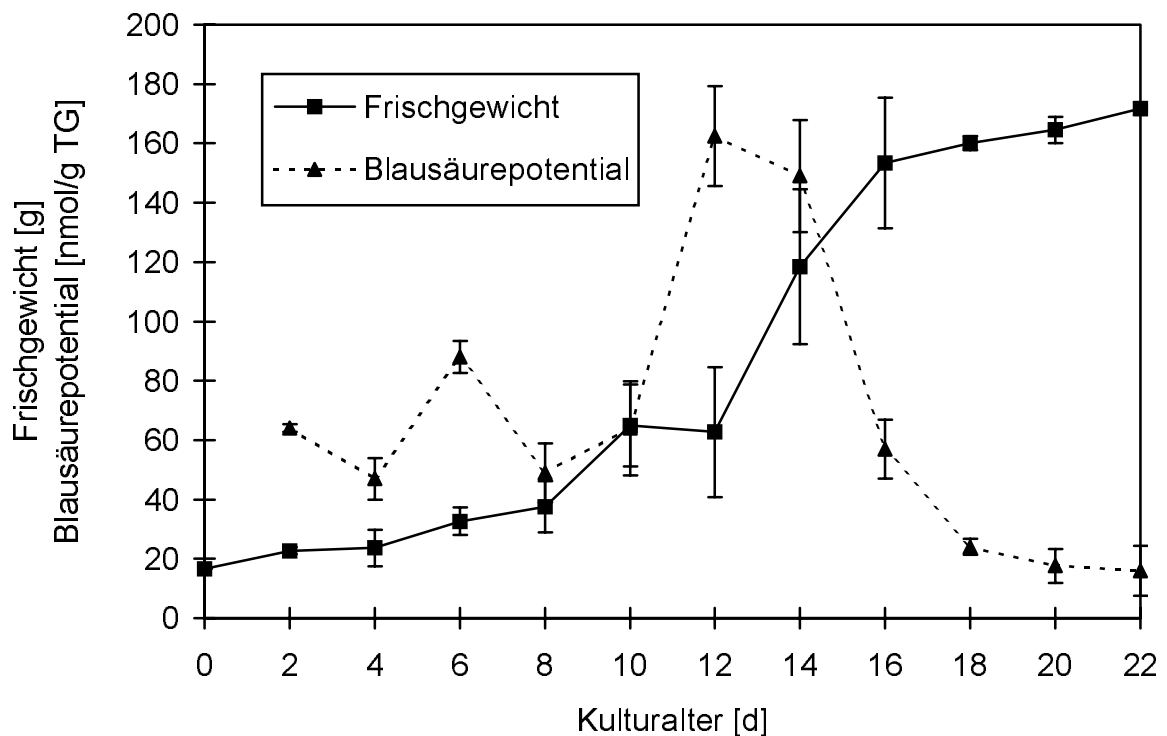


Abbildung 23: Blausäurepotenzial und Frischgewicht der Wurzelflüssigkultur in Abhängigkeit der Kulturdauer

Dargestellt ist die Summe der cyanogenen Verbindungen, die enzymatisch als Blausäurepotenzial bestimmt wurden (siehe Kapitel 2.2.7.9). Abgebildet sind die Mittelwerte dreier Wachstumszyklen mit jeweils drei parallelen Bestimmungen.

Das in Abbildung 23 dargestellte Blausäurepotenzial der Wurzelflüssigkultur zeigte, wie das der Zellsuspensionen, im Verlauf des Wachstumszyklus deutliche Schwankungen. In Abhängigkeit von der Kulturdauer enthielten die Wurzeln zwischen 15 nmol/g TG und 160 nmol/g TG potenziell freisetzbare Blausäure. Die

Konzentration cyanogener Glycoside lag damit deutlich unter der von den Zellsuspensionen gebildeten Konzentration blausäurehaltiger Verbindungen.

Der Vergleich der Kurven (Abbildungen 22 und 23) zeigt, dass nicht nur die Konzentrationen cyanogener Glycoside in Zell- und Wurzelkulturen differieren, sondern sich auch die Kurvenverläufe und damit einhergehend der Zeitpunkt der Akkumulation cyanogener Glycoside grundsätzlich voneinander unterscheiden.

So akkumulierten die transformierten Wurzeln die größten Mengen cyanogener Glycoside während der Phase linearen Wachstums, wohingegen die Zellsuspensionskulturen das höchste Blausäurepotenzial während der lag-Phase aufwiesen. In der Zeit der lag-Phase und auch mit Beginn der stationären Phase ging in den Wurzelflüssigkulturen der Gehalt cyanogener Glycoside stark zurück und erreichte mit 15 nmol/g TG am Ende der Kulturdauer seinen Minimalwert.

Die stärkste Aktivität des Stoffwechsels cyanogener Glycoside und vermutlich auch des übrigen Sekundärstoffwechsels war bei den Wurzelkulturen von *Linum usitatissimum* damit im Gegensatz zu den Zellsuspensionen immer mit einer starken Zellvermehrung verbunden.

Bei den Zellsuspensionskulturen von *Phytolacca americana* und *Chenopodium rubrum* wurde entgegen der Zellkulturen von *Linum usitatissimum* eine Akkumulation vom Betacyanen in der logarithmischen Wachstumsphase beobachtet (HEß, 1995).

Das in Abbildung 23 dargestellte Blausäurepotenzial der Wurzelkulturen ermöglicht eine genaue Unterscheidung und damit auch Bilanzierung von endogenem und in den Aufnahmeversuchen mit Linustatin (Kapitel 3.2.9) aufgenommenem Linustatin. Anhand des Kurvenverlaufs kann für die Aufnahmeversuche optimal geeignetes Material ausgesucht werden.

Für die Aufnahmeversuche von Linustatin in die Wurzeln der Flüssigkulturen (Kapitel 3.2.9) wurden Wurzeln 8 Tage nach der Inokulation ausgewählt. Da die Ergebnisse aus Abbildung 23 zeigten, dass die Wurzeln zu diesem Zeitpunkt nur wenig cyanogene Glucoside enthalten und das Blausäurepotenzial in den darauffolgenden zwei Tagen kaum ansteigt. Die Wurzeln zeigten aber eine steigende Wachstumsrate und hatten einen hohen Bedarf Nährstoffe aufzunehmen.

Zusammenfassend läßt sich über das Blausäurepotenzial von *Linum* feststellen, dass sowohl in allen Organen der Leinpflanze als auch in allen untersuchten Zell- und Wurzelflüssigkulturen unterschiedlicher Leinvarietäten cyanogene Verbindungen nachgewiesen wurden.

Die Gehalte in den aus Lein etablierten Kulturen waren mit Konzentrationen von 10 bis 350 nmol/gTG um ein Vielfaches niedriger als in der intakten Pflanze (25 - 350 µmol/g TG). Damit war der Gehalt cyanogener Verbindungen in den etablierten Zellsuspensionskulturen deutlich geringer, selbst wenn die Kultur aus einem stark cyanogenen Gewebe initiiert worden war.

Für die Zellsuspensionen und Wurzelflüssigkulturen von *Linum usitatissimum* wurde eine Veränderung des Blausäurepotenzials in Abhängigkeit von der Kulturdauer festgestellt. Die Zellen zeigten ihr größtes Potenzial bei geringer Zellvermehrung, während die Wurzeln die meisten cyanogenen Glycoside in der aktivsten Wachstumsphase akkumulierten. Diese Daten über das Blausäurepotenzial im Wachstumsverlauf sind die Grundlage für eine genaue Bilanzierung zwischen endogenen und aufgenommenen cyanogenen Glycosiden der Aufnahmeuntersuchungen, die in Kapitel 3.2.9 beschrieben werden. Die Zellen am 6. Tage und Wurzeln am 8. Tag nach der Inokulation eignen sich optimal für Aufnahmeuntersuchungen.

Diese Angaben des Gehaltes freisetzbarer Blausäure ermöglichten allerdings keine Aussagen über die Verteilung von Mono- und Diglucosiden innerhalb des Blausäurepotenzials oder über das Spektrum der cyanogenen Glycoside in den Zellsuspensionen und Wurzelflüssigkulturen. Um diese Fragen zu klären mußten weitere analytische Verfahren wie Gaschromatographie oder HPLC der methanolischen Extrakte angewandt werden.

3.2.6 Spektrum cyanogener Glycoside in Zellsuspensions- und Wurzelflüssigkulturen von *Linum usitatissimum*

Um die Zusammensetzung des in Kapitel 3.2.5.4 und 3.2.5.5 bestimmten Blausäurepotenzial der Suspensions- bzw. Flüssigkulturen zu bestimmen, erfolgte eine gaschromatographische Analyse der Silylderivate der cyanogenen

Glycoside. Für die Untersuchungen der cyanogenen Glycoside ist die Gaschromatographie besonders geeignet. Sie erlaubt eine gleichzeitige Analyse der Zusammensetzung des Blausäurepotenzials und eine Gehaltsbestimmung der cyanogenen Glucoside in den Proben. Auf diese Weise konnten Aussagen darüber getroffen werden, ob in Zellsuspensionen und Wurzelflüssigkulturen die gleichen oder andere cyanogenen Glycoside synthetisiert und akkumuliert werden als in der intakten Leinpflanze. Im Falle der Kalluskulturen von *Schlechteria mitostemmatoïdes* (JÄGER ET AL., 1995) wurden die gleichen cyanogenen Glucoside akkumuliert wie in den Pflanzen, wohingegen in den Zellsuspensionskulturen von *Eschscholtzia californica* Cham cyanogene Glucoside mit anderen Strukturen als in den Pflanzen gefunden wurden (HÖSEL, 1985).

3.2.6.1 Überprüfung der gaschromatographischen Meßmethode

Zunächst wurde der methodische Fehler untersucht und die Grenzen des Meßbereiches ermittelt, in dem ein linearer Zusammenhang zwischen eingesetzter Stoffmenge und detektierter Peakfläche bestand. Die Bestimmung des methodischen Fehlers erfolgte mit Phenylglucosidlösung. Es wurden zehnmal 100 µL zur Derivatisierung eingesetzt und über die Gaschromatographie analysiert. Die erreichte Standardabweichung der resultierenden Peakflächen betrug $\pm 6\%$.

Um die Grenzen des Meßbereiches festzulegen, erfolgte eine Kalibrierung mit Proben definierter Gehalte an cyanogenen Glycosiden (siehe Abbildung 24).

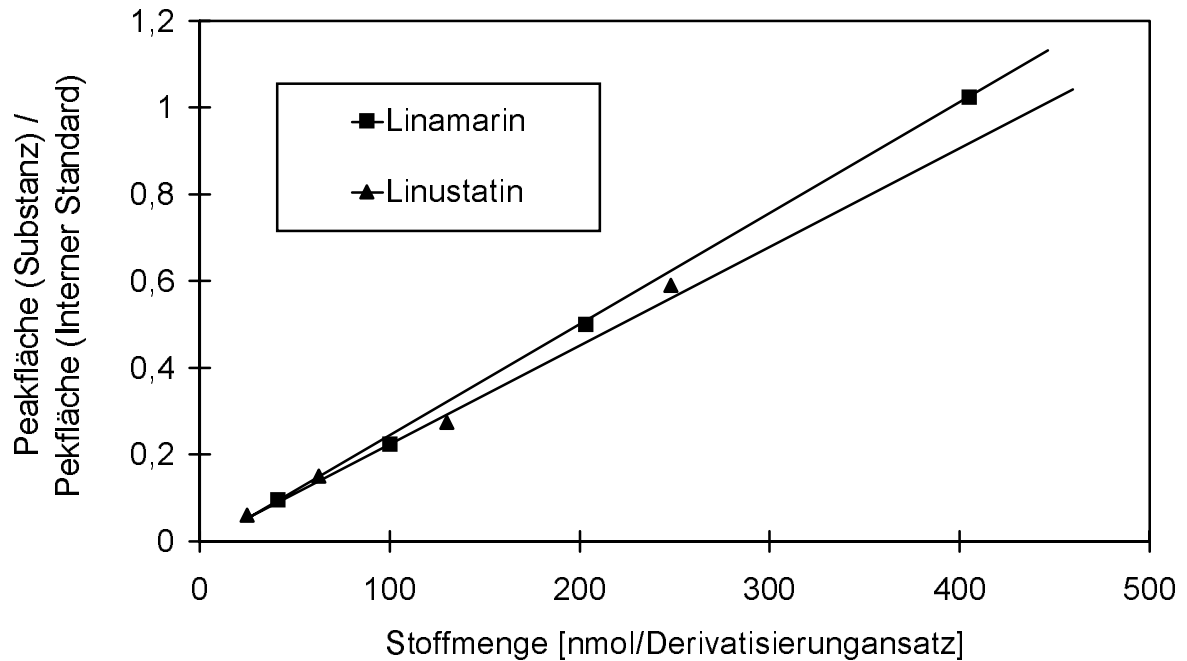


Abbildung 24: Kalibriergerade für die gaschromatographische Bestimmung cyanogener Glycoside

Proben definierter Gehalte der Standardsubstanzen wurden gemäß Kapitel 2.2.7.9.2 derivatisiert und über die Gaschromatographie analysiert.

Wie die Kalibrierkurve (Abbildung 24) zeigt, wurde eine hohe Nachweisempfindlichkeit erzielt. Die untere Grenze der Nachweisempfindlichkeit betrug 1 nmol je Probe. Bei Gehalten von mehr als 1 µmol/Probe war die obere Grenze auf Grund der Überlastung der Säule erreicht. Diese wird angezeigt durch eine Veränderung der Peaksymmetrie (SCHOMBURG, 1987).

3.2.6.2 Gehalt cyanogener Glycoside in Zellsuspensionen von *Linum usitatissimum* im Verlauf eines Wachstumszyklus

Durch die gaschromatographische Analyse der Silylderivate der cyanogenen Glycoside konnten nur die cyanogenen Glycoside, deren Retentionszeit bekannt war, zu den detektierten Peakflächen zugeordnet werden. Dies war für die Monoglucoside Linamarin und Lotaustralin und für die Diglucoside Linustatin und Neolinustatin möglich. Mit Hilfe von Standardlösungen bekannter Konzentration wurden Kalibriergeraden erstellt, so daß auch eine quantitative Auswertung über die Peakflächen für die einzelnen cyanogenen Glycoside erfolgen konnte (siehe Abbildung 25).

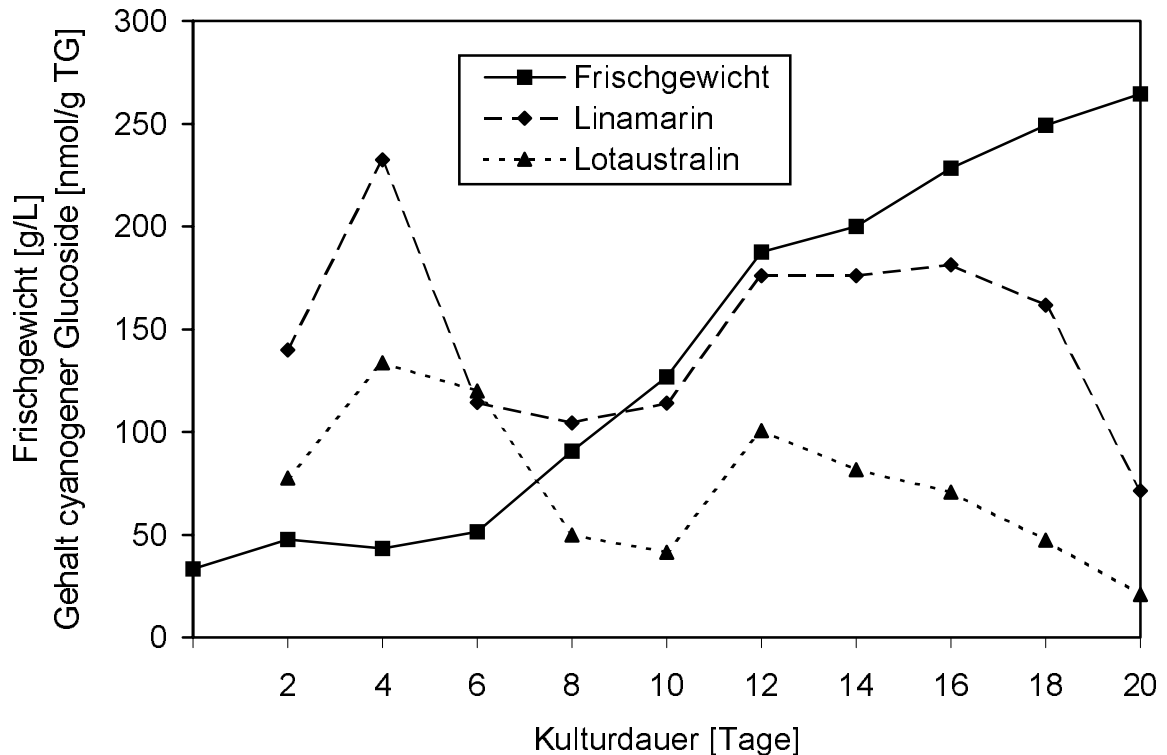


Abbildung 25: Gehalt cyanogener Glycoside in Zellsuspensionen von *Linum usitatissimum* in Abhängigkeit von der Kulturdauer

Für die Bestimmung der cyanogener Glucoside wurden die gefriergetrockneten Proben methanolisch extrahiert, anschließend derivatisiert und gaschromatographisch analysiert (siehe Kapitel 2.2.7.9). Die Kultivierung der Zellen und die Durchführung der Bestimmung des Frischgewichtes sind in Kapitel 2.2.7.1 und 2.2.7.2 aufgeführt. Abgebildet sind die Mittelwerte dreier Wachstumszyklen mit jeweils drei parallelen Bestimmungen.

In den Zellsuspensionen von *Linum usitatissimum* wurden über den gesamten Wachstumsverlauf nur cyanogene Monoglucoside, aber keine Diglucoside nachgewiesen. Bei den detektierten Glycosiden handelte es sich um Linamarin und Lotaustralin, zwei der cyanogenen Glycoside, die auch in den intakten Leinpflanzen vorkommen.

Ein Vergleich der Konzentrationen von Linamarin und Lotaustralin zeigte, dass Linamarin fast über den gesamten Beobachtungszeitraum in 1,5-fach höherer Konzentration vorlag als Lotaustralin. Eine Ausnahme bildete hier die Zeit vom 2.-6. Kulturtag, an dem die Konzentration von Linamarin und Lotaustralin nahezu gleich groß waren. Damit verteilte sich das Blausäurepotenzial nicht auf ein Haupt- und ein Nebenglucosid. Die Konzentrationsänderungen beider Glucoside in Abhängigkeit von der Zeit waren ähnlich wie der Verlauf des gesamten Blausäurepotenzials. So wurden sowohl die größten Mengen Linamarin während

der Wachstumsphasen mit geringer Zellvermehrung akkumuliert, als auch die höchsten Konzentrationen von Lotaustralin zu diesen Zeiten nachgewiesen.

Die Summe der Konzentrationen von Linamarin und Lotaustralin ist nahezu identisch mit dem enzymatisch bestimmten Blausäurepotenzial. Das heißt, dass neben diesen beiden Monoglucosidin keine weiteren cyanogenen Glycoside in größeren Mengen in den Zellsuspensionen von *Linum usitatissimum* vorkommen. Möglich ist jedoch, dass andere cyanogenen Glucoside, wie Linustatin, in kleinsten Mengen vorkommen, die mit Hilfe dieser Methode nicht nachweisbar waren.

Um zu prüfen, ob das cyanogene Diglucosid Linustatin, das in der intakten Pflanze eine wichtige Rolle als Transportform des Linamarins spielt, in den Zellsuspensionen vorkommt, wurde eine HPLC-Analyse der methanolischen Extrakte eingesetzt. Dazu wurde, im Vergleich zu den gaschromatographischen Bestimmungen, eine 10-fach höhere Menge an gefriergetrockneten Zellen methanolisch extrahiert. Dieser methanolische Extrakt wurde über die HPLC aufgetrennt (siehe Kapitel 2.2.9.3).

Der Einsatz einer so großen Menge Zellmaterial war für die Gaschromatographie nicht möglich, da während der Derivatisierung der Proben Störreaktionen auftraten und sich der Reaktionsansatz stark verbräunte. Auch durch eine Modifikation des Derivatisierungsansatzes war diese Veränderung der Reaktionsprodukte oder der Derivatisierungsmittel nicht zu beeinflussen.

Die HPLC-Chromatogramme der methanolischen Zellextrakte wiesen zwar eine Substanz auf, die zur gleichen Retentionszeit eluiert wie Linustatin. Doch eine Additionsanalyse dieser Probe mit einem Linustatinstandard zeigte, dass diese unbekannte Substanz nicht mit dem Linustatinstandard identisch war. Um sicher zu stellen, dass der Peak dieser Substanz nicht ein mögliches Signal von Linustatin überlagert hat, wurde erneut ein methanolischer Zellextrakt chromatographiert und fraktioniert gesammelt. Aus der Fraktion, die zur Retentionszeit von Linustatin eluiert, wurde das Methanol ausgetrieben und die Probe mittels einer Vakuumzentrifuge eingeeengt. Die erhaltene Lösung wurde enzymatisch hydrolysiert und anschließend die Konzentration an Cyanid bestimmt (siehe Kapitel 2.2.7.8.3). Die spektralphotometrisch vermessene Probe wies kein Cyanid

auf, so dass davon ausgegangen wurde, dass die Zellsuspensionen kein Linustatin enthielten.

3.2.6.3 Gehalt cyanogener Glycoside in Wurzelflüssigkulturen von *Linum usitatissimum*

Um zu klären welche cyanogenen Glucoside das in Kapitel 3.2.5.5 bestimmte Blausäurepotenzial der Flüssigkultur bilden, erfolgte ebenfalls eine gaschromatographische Analyse der Silylderivate der cyanogenen Glycoside. Auf diese Weise sollte die Frage geklärt werden, ob die Wurzelkulturen die gleichen cyanogenen Glycoside synthetisieren und akkumulieren wie die intakte Leinpflanze.

Eine Identifizierung der cyanogenen Glycoside erfolgte sowohl über Co-Chromatographie als auch über den Vergleich der Retentionszeiten mit Standards der Reinsubstanzen.

Das Blausäurepotenzial der Wurzelkulturen wies im Wachstumsverlauf unterschiedlich große Konzentrationen an cyanogenen Glycosiden auf, dabei lagen die Gehalte in den Phasen geringer Zellvermehrung zwischen 15 und 40 nmol/g TG. Es wurde davon ausgegangen, dass sich diese relativ geringen Mengen Blausäure freisetzenden Verbindungen auf unterschiedliche cyanogene Glycoside verteilen. Die in der Gaschromatographie detektierten Signale für Linamarin, Linustatin, Neolinustatin und Lotaustralin - wenn sie in den Wurzeln enthalten sind - würden folglich unter der Nachweisgrenze liegen. Es wurde daher verzichtet, die Zusammensetzung des Blausäurepotenzials über den gesamten Wachstumszyklus zu ermitteln. Da während der linearen Wachstumsphase das höchste Blausäurepotenzial detektiert wurde, wurden nur diese Probe (12 Tage alte Kultur) für weitere Analysen eingesetzt (siehe Abbildung 26).

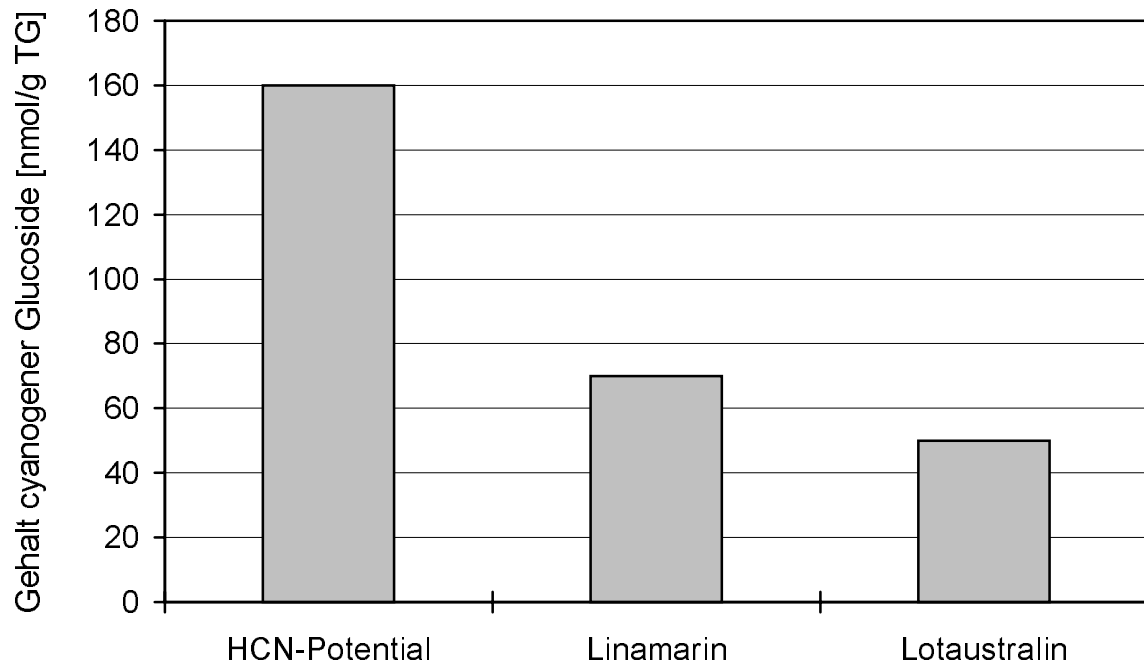


Abbildung 26: Gehalt cyanogener Glucoside in 12 Tage alten Wurzelflüssigkulturen

Für die Bestimmung der cyanogener Glucoside wurden die gefriergetrockneten Proben methanolisch extrahiert, anschließend derivatisiert und gaschromatographisch analysiert (siehe Kapitel 2.2.7.9). Die Kultivierung der Wurzeln und die Durchführung der Bestimmung des Frischgewichtes sind in Kapitel 2.2.7.1 und 2.2.7.2 aufgeführt. Dargestellt ist der Mittelwert von fünf getrennten Bestimmungen.

Das Blausäurepotenzial in den Wurzeln, die 12 Tage lang kultiviert wurden, betrug 160 nmol/gTG und setzte sich, wie die GC-Analysen zeigten, aus 70 nmol/g TG Linamarin und 50 nmol/g TG Lotaustralin zusammen. Neben diesen beiden Monoglucosiden enthalten die Wurzeln noch 30 nmol/g TG weitere cyanogene Glucoside, die nicht identifiziert werden konnten und nicht mit den in der intakten Pflanzen vorkommenden Glucosiden übereinstimmten. Die cyanogenen Diglucoside Linustatin und Neolinustatin wurden durch die Auftrennung der methanolischen Extrakte über die Gaschromatographie nicht nachgewiesen.

Auch für diese Extrakte wurde eine weitere Untersuchung mit HPLC durchgeführt um sicherzustellen, dass Linustatin nicht in sehr geringer Konzentration vorkommt und so durch die GC-Analyse nicht detektiert werden konnte. Wie für die Zellextrakte wurde eine 10-fache höhere Menge an gefriergetrockneten Wurzeln auf die gleiche Weise methanolisch extrahiert, wie sie für die gaschromatographischen Bestimmungen verwendet wurde. Dieser methanolische

Extrakt wurde durch einen Filter sedimentiert und über die HPLC aufgetrennt (siehe Kapitel 2.2.9.3).

Der Einsatz einer so großen Menge transformierter Wurzeln war für die Gaschromatographie ebenfalls nicht möglich, da während der Derivatisierung der Reaktionsansatz stark verbräunte.

Die Ergebnisse der Trennung der Wurzelextrakte über HPLC zeigten kein Linustatin, dennoch wurde das Eluat zur Retentionszeit von Linustatin fraktioniert gesammelt und für eine enzymatische Hydrolyse und anschließend für einen Cyanid-Test (siehe Kapitel 2.2.7.8.3) eingesetzt. Auf diese Weise konnte die Nachweisempfindlichkeit um das 100-fache gesteigert werden. Doch auch diese Nachweismethoden führten zu dem Ergebnis, dass die transformierten Wurzeln kein Linustatin enthielten.

Das Kapitel 3.2.6 zeigt **zusammenfassend** folgende Ergebnisse:

Die Optimierung der Gaschromatographie führte zu einer Nachweisempfindlichkeit von 1 nmol/Probe. Mit Hilfe dieser Methode konnten die cyanogenen Glycoside Linamarin, Linustatin, Lotaustralin und Neolinustatin nachgewiesen und quantifiziert werden.

Dabei wurde in den Zellsuspensionen nur die cyanogene Monoglucoside Linamarin und Lotaustralin, die auch in den intakten Leinpflanzen vorkommen detektiert. Die Wurzelkulturen enthalten neben diesen Monoglucosiden noch weiter nicht identifizierte Cyanglycoside. Die in Lein ebenfalls vorkommenden cyanogenen Diglucoside Linustatin und Neolinustatin wurden dagegen weder in den Zellsuspensionen noch in den Wurzellflüssigkulturen nachgewiesen. Auch bei dem Einsatz größerer Mengen Probenmaterial in der HPLC wurde kein Linustatin detektiert.

Die Gehalte der beiden Monoglucoside zeigten im Wachstumsverlauf der Zellsuspension eine starke Schwankung, die mit der Änderung des Blausäurepotenzials während der Kulturdauer übereinstimmte. Während der lag-Phase, mit geringer Wachstumsrate, enthielten die Zellen die größten Konzentrationen an Linamarin und Lotaustralin, wohingegen die Konzentrationen der beiden Monoglucoside in der linearen-Wachstumsphase stark abnahmen.

Während der Kulturdauer lag der Gehalt an Linamarin immer 50 % über der von Lotaustralin. Dabei stimmte die Summe der Konzentrationen an Linamarin und Lotaustralin mit der Höhe des Blausäurepotenzials überein. Neben diesen beiden Monoglucosiden kommen in den Zellsuspensionen folglich keine weiteren cyanogenen Glycoside in größeren Mengen vor.

In Flüssigkultur transformierter Wurzeln überstieg die Konzentration an Linamarin ebenfalls die des Lotaustralins. In den Wurzelkulturen war die Summe der Konzentrationen der cyanogenen Monoglucoside kleiner als das Blausäurepotenzial. Diese Differenz wies auf das Vorkommen weiterer nicht identifizierter cyanogener Glycoside hin, die nicht mit den in Leinpflanzen vorkommenden Mono- und Diglucosiden identisch sind.

Nachdem die Frage geklärt wurde, welche cyanogenen Glucoside in den Zellsuspensionen und Wurzellflüssigkulturen enthalten sind und wie sich das Blausäurepotenzial während des Wachstumsverlaufes ändert, erwiesen sich Zellen 6 Tage und Wurzeln 8 Tage nach der Inokulation optimal für eine Aufnahmeuntersuchung mit Linustatin geeignet. Für die Beurteilung der Ergebnisse aus den Aufnahmeversuchen mußte jedoch noch ermittelt werden, welche am Abbau der cyanogenen Glucoside in Pflanzen beteiligten Enzyme in den Suspensions- und Flüssigkulturen vorkommen. Diese Enzyme könnten zugesetztes Linustatin zu Linamarin oder zu nicht cyanogenen Verbindungen abbauen und somit den Gehalt an aufgenommenen Linustatin deutlich beeinflussen. Da eine im Medium bzw. im apoplastischen Zellwandbereich lokalisierte Linamarase und eine Linustatinase das applizierte Cyanglucosid vor einer Aufnahme spalten würde, kam der Lokalisation dieser Enzyme besonders große Aufmerksamkeit zu.

3.2.7 Untersuchungen der am Abbau cyanogener Glucoside beteiligten Enzyme

Die Konzentrationen cyanogener Glycoside zeigten im Verlauf des Wachstumszyklus starke Schwankungen. Es wurde daher untersucht, ob die Abnahme des Blausäurepotenzials auf eine verletzungsbedingte Cyanogenese zurückzuführen ist oder eine Metabolisierung der cyanogenen Glycoside stattfindet. Dazu wurde ein Kulturkolben mit einer Natronlaugevorlage versehen

und unter Luftabschluß für 10 Tage kultiviert. In dieser Natronlauge wurde keine Blausäure nachgewiesen. Es wurden keine cyanogenen Glucoside außerhalb des Cytoplasmas zu Blausäure abgebaut. Damit hatte keine verletzungsbedingte Cyanogenese bei der in Folge einer Dekompartimentierung hydrolytische Enzyme mit den Cyanglucosiden in Kontakt kommen, bis zu diesem Zeitpunkt stattgefunden. Es kann angenommen werden, dass die Änderungen im Blausäurepotenzial auf eine Umsetzung zurückzuführen sind.

Für die Aufnahmeuntersuchungen mit appliziertem Linustatin waren besonders die am Abbau von cyanogenen Glucosiden beteiligten Enzyme von Bedeutung.

Dazu gehören die Linamarin und Linustatin spaltenden Enzyme (Linustatinase und Linamarase), die Rhodanase und die β -Cyanoalaninsynthase. Die beiden letzten Enzyme katalysieren die Refixierung der freigesetzten Blausäure und sind damit für den Abbau cyanogener Glycoside zu nicht cyanogenen Verbindungen verantwortlich. So kann der Stickstoff der cyanogenen Glycoside in den allgemeinen Stickstoff-Stoffwechsel als Aminosäuren eingespeist werden. (CONN, 1984). Die Linustatinase leitet die vollständige Umsetzung der cyanogenen Glucoside ein, und darüber hinaus kann das entstehende Linamarin als Monoglucosid (BAHN, 1992) in den Zellen der Blätter und Wurzeln akkumuliert werden.

In dieser Arbeit wurden die Aktivitäten dieser vier Enzyme sowohl in Zellsuspensionen und Wurzelflüssigkulturen als auch in den vegetativen Organen der Leinpflanze (Wurzel, Spross und Blatt) bestimmt und verglichen.

Um Hinweise auf die Lokalisation der hydrolytischen Enzyme zu erlangen, wurden die Aktivitätsbestimmungen auf die Kulturmedien ausgedehnt und Untersuchungen mit einem symplastischen Markerenzym durchgeführt. Aufschluß über die Lokalisation der Enzyme erbrachte jedoch erst der Vergleich der Enzymaktivitäten eines Gesamtzellextraktes mit der Aktivität in isolierten Protoplasten. Bei gleicher Aktivität im Gesamtzellextrakt und den Protoplasten muß die gesamte β -Glucosidase im Symplasten lokalisiert sein. Ergibt sich eine Differenz zwischen der Aktivität in Protoplasten und Gesamtextrakt, so liegt dieser Differenzbetrag der Aktivität als apoplastisches Enzym vor (Kapitel 3.2.8).

3.2.7.1 Linamarase

Diese Linamarase in Leinpflanzen ist, wie viele andere β -Glucosidasen auch im Zellwandbereich lokalisiert (GRUHNERT et al., 1994) und kann unter der Verwendung eines Natriumacetatpuffers (0,1 mol/L; pH 6) extrahiert werden (FAN und CONN, 1985). Der apoplastische Anteil dieses Enzyms im Vergleich zum Gesamthomogenat beträgt 30-40 % (GRUHNERT et al., 1994). In *Hevea brasiliensis* kommt eine Linamarin spaltende β -Glucosidase vor, die nahe zu vollständig mit einem hypotonischen Puffer extrahierbar ist. Neben diesem Enzym existiert im Kautschukbaum eine weitere β -Glucosidase, die den sequentiellen Abbau von Linustatin einleitet. Diese ist auf Grund der Präparation so stark an die Zellwand assoziiert, dass sie nur durch Verwendung einer hohen Salzkonzentration im Medium (1,2 mol/L NaCl) extrahiert werden kann (HILLMAR, 1999). Auch in Zellsuspensionen von *Manihot esculenta* ist die β -Glucosidase nur unter Hochsalz-Bedingungen zu extrahieren (HEIDBREDE, 1999), während das Enzym aus Blättern dieser Pflanze unter Verwendung eines hypotonischen Puffers isoliert wurde (MKPONG et al., 1990).

Auf Grund der unterschiedlichen Daten in der Literatur über die Extrahierbarkeit des Enzyms erfolgte in dieser Arbeit die Bestimmung der Linamaraseaktivität für die Wurzelflüssigkulturen und Zellsuspensionen als auch für die Pflanzenorgane mit einem hypotonischen Puffer und unter Verwendung eines Puffersystems mit 1,2 M NaCl. Der Enzymextrakt, der mit hoher Salzkonzentration hergestellt wurde, wird im folgenden Hochsalzextrakt genannt. Der Extrakt mit hypotonischem Puffer wird als Niedersalzextrakt bezeichnet.

Istock (1987) konnte auch im Medium von Zellsuspensionskulturen von *Phaseolus lunatus* eine β -Glucosidase nachweisen. Da auch im Medium der Suspensionen und Flüssigkulturen von *Linum usitatissimum* möglicherweise β -Glucosidasen vorhanden sind, wurde die β -Glucosidase-Aktivität auch im Kulturmedium der Suspensions- und Flüssigkulturen bestimmt. Der Nachweis einer β -Glucosidase im Medium und in den verschiedenen Hoch- und Niedersalzextrakten diente zunächst nur der quantitativen Extraktion der β -Glucosidaseaktivität und der Klärung ihrer Extrahierbarkeit. Eine Lokalisation dieses Enzyms kann erst durch Untersuchungen an Protoplasten aufgeklärt werden (Kapitel 3.2.8).

In Abbildung 27 sind die Linamaraseaktivitäten in Organen der Leinpflanze dargestellt.

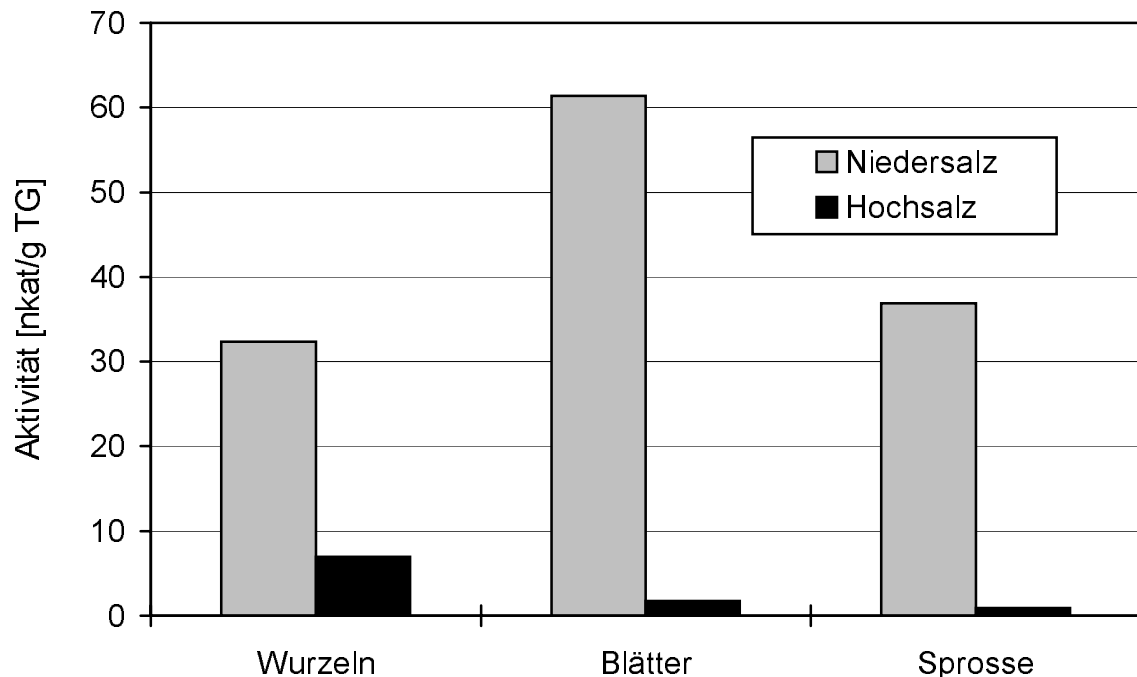


Abbildung 27: Linamaraseaktivität in Pflanzenorganen von *Linum usitatissimum*

Die Linamaraseaktivität wurde mit Linamarin als Substrat im Thunberg-Gefäß bestimmt. Für den Niedersalzextrakt wurde ein Gesamtextrakt mit Citrat-Phosphat-Puffer (40 mmol/L, pH 5,6; 2 mmol/L Na-Ascorbat) hergestellt. Für den Hochsalzextrakt wurde der mehrfach nachextrahierte, unlösliche Homogenisationsrückstand des Gesamtextraktes mit 1 M NaCl-Lösung behandelt (siehe Kapitel 2.2.8.2). Dargestellt sind die Mittelwerte aus den Bestimmungen für drei verschiedene Pflanzen.

In allen untersuchten Fraktionen der unterschiedlichen Pflanzenorgane wurde Linamaraseaktivität nachgewiesen (Abbildung 27). Sowohl die Nieder- als auch die Hochsalzextrakte zeigten Enzymaktivität, die sich allerdings auf diese beiden Extrakte sehr unterschiedlich verteilte. Während in der mit hypotonischem Puffer extrahierten Enzymlösung zwischen 80 und 99 % der β -Glucosidase nachgewiesen wurde, wiesen die Hochsalzextrakte der drei Organe nur geringe Enzymaktivität auf. Bei der in den vegetativen Leinorganen vorkommenden β -Glucosidase handelt es sich damit um ein lösliches Enzym, wie auch bei dem Enzym in Leinsamen (FAN und CONN, 1985), das mit Hilfe eines 40 mM Phosphat-/Citrat-Puffers extrahiert werden konnte. In wieweit die Anteile, die unter Hochsalzbedingungen extrahiert werden konnten, auf ein anderes Enzym oder auf eine Assoziation an die Zellwand zurückzuführen sind, kann mit diesen Daten nicht geklärt werden.

Die Enzymaktivität der Linamarase lag in den einzelnen Organen zwischen 30 und 60 nkat/g TG, wobei die Aktivität in den Blättern am höchsten war. Fan und Conn (1985) detektierten in Leinsamen eine Linamarase mit ähnlicher Aktivität wie die der vegetativen Organe von *Linum usitatissimum*.

In Abbildung 28 sind die Linamaraseaktivitäten der Zellsuspensionskulturen dargestellt.

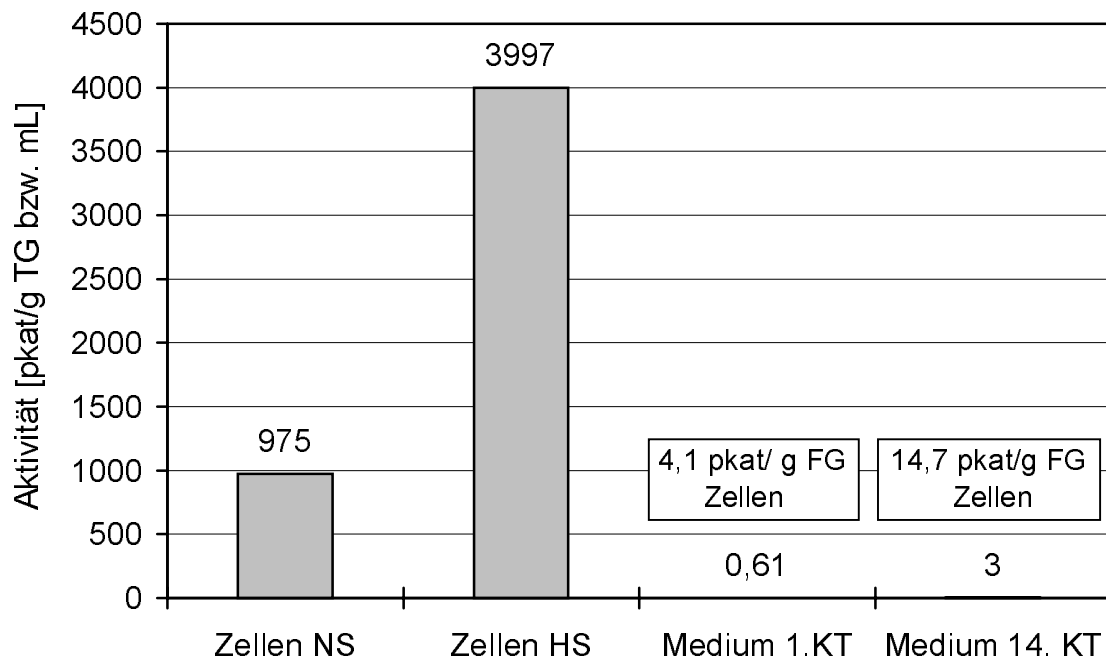


Abbildung 28: Linamaraseaktivität in Zellen und Medium der Zellsuspensionskultur von *Linum usitatissimum*

Die Linamaraseaktivität wurde mit Linamarin als Substrat im Thunberg-Gefäß bestimmt. Der Niedersalzextrakt (NS) wurde als Gesamtextrakt mit Citrat-Phosphat-Puffer (40 mmol/L, pH 5,6; 2 mmol/L Na-Ascorbat) hergestellt. Für den Hochsalzextrakt (HS) wurde der mehrfach nachextrahierte unlösliche Homogenisationsrückstand des Gesamtextraktes mit 1 M NaCl-Lösung behandelt (siehe Kapitel 2.2.8.2). Die Konzentrierung des Enzyms aus dem Medium erfolgte in einem Centriprep-Konzentrator (Centriprep 3, Trenngrenze 3.000 D, Amicon). Dargestellt sind die Mittelwerte der Bestimmungen aus drei verschiedenen Kulturkolben nach einer Kulturdauer von 14 Tagen.

NS: Niedersalzextrakt; HS: Hochsalzextrakt; KT: Kulturtag

In den Zellen der Zellsuspensionskulturen wurde sowohl in der Nieder- als auch in der Hochsalzfraktion eine Linamarin spaltende β -Glucosidase nachgewiesen (Abbildung 28). Wie die Verteilung der extrahierten Enzymaktivität zwischen Nieder- und Hochsalzextrakt zeigt, ist in der Zellsuspensionskultur im Gegensatz zu der intakten Leinpflanze ein wesentlich größerer Anteil der Aktivität durch den Hochsalzpuffer extrahierbar. Von der Gesamtaktivität, die in den Zellen detektiert wurde, wurden nur 20 % im Nieder- und 80 % in dem Hochsalzextrakt

nachgewiesen. Diese Aktivitätsverteilung stimmt mit den Daten von *Manihot esculenta* überein, in deren Zellkulturen Heidbrede (1999) unter Zugabe von 1,2 M Kochsalz 95 % der β -Glucosidaseaktivität extrahierte.

Die Gesamtaktivität der Linamarase bezogen auf die Trockenmasse beträgt in den Zellsuspensionskulturen 1/10 der in Leinpflanzen vorkommenden Linamaraseaktivität, entspricht aber den Aktivitäten wie sie auch in Zellsuspensionen von Maniok bestimmt wurden (HEIDBREDE, 1999). Handelt es sich bei der β -Glucosidase in Leinpflanzen und Zellkulturen um das gleiche Enzym, sollten die Eigenschaften und damit die Extrahierbarkeit gleich sein. Da die Verteilung der β -Glucosidase zwischen den Nieder- und Hochsalzextrakten unterschiedlich ist, wurde vermutet, dass in den Zellkulturen mehrere β -Glucosidasen vorkommen. Eines dieser Enzyme ist im Niedersalzextrakt löslich und kann unter hypotonischen Bedingungen extrahiert werden, seine Aktivität ist in den Zellkulturen gegenüber der Leinpflanze stark reduziert. Das andere Enzym wurde erst unter Hochsalzbedingungen extrahiert und zeigt somit eine starke Assoziation an die Zellwand. Die Höhe der Aktivität dieses Enzyms in der Zellkultur ist vergleichbar mit der aus den Leinorganen. Auch für die Leinpflanze wird daher vermutet, dass neben einer im Niedersalzextrakt löslichen β -Glucosidase eine weitere vorkommt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Linamarin hydrolysierende β -Glucosidase der Zellsuspensionskulturen von *Linum usitatissimum* im Hochsalzextrakt an die Zellwand assoziiert ist, dabei kann über die intrazelluläre Lokalisation dieses Enzyms keine Aussage getroffen werden, da nur Gesamtextrakte untersucht wurden. Es kann sich um ein symplastisches Enzym handeln, das während der Präparation artefaktisch an die Zellwand gebunden wird oder um ein apoplastisches, das dauerhaft oder artefaktisch an die Zellwand gebunden vorliegt. Die Untersuchungen der Kulturmedien sollten weitere Hinweise zur Klärung dieser Frage geben.

Das Kulturmedium zeigte nach einem Kulturtag nur eine sehr geringe Linamaraseaktivität von 0,6 pkat/mL Medium (siehe Abbildung 28). Bezogen auf die in diesem Medium kultivierten Zellen ergibt sich eine Aktivität von 77 pkat/gTG. Das Medium besaß nur 1,5 % der Linamaraseaktivität, die in den

Zellen bestimmt wurde. Die Linamaraseaktivität im Medium erhöhte sich über 14 Kulturtage auf 4,2 % der Gesamtaktivität (220 pkat/g TG Zellen). Die im Medium gefundene Linamaraseaktivität könnte durch ein apolastisches Enzym oder durch symplastische Enzyme, die auf Grund der Verletzungen der Zellen im Medium vorlagen, hervorgerufen worden sein. Um diese Frage zu klären, wurden analoge Studien mit einem Markerenzym durchgeführt (siehe Kapitel 3.2.7.5).

In Abbildung 29 sind die Linamaraseaktivitäten der Wurzelflüssigkulturen dargestellt.

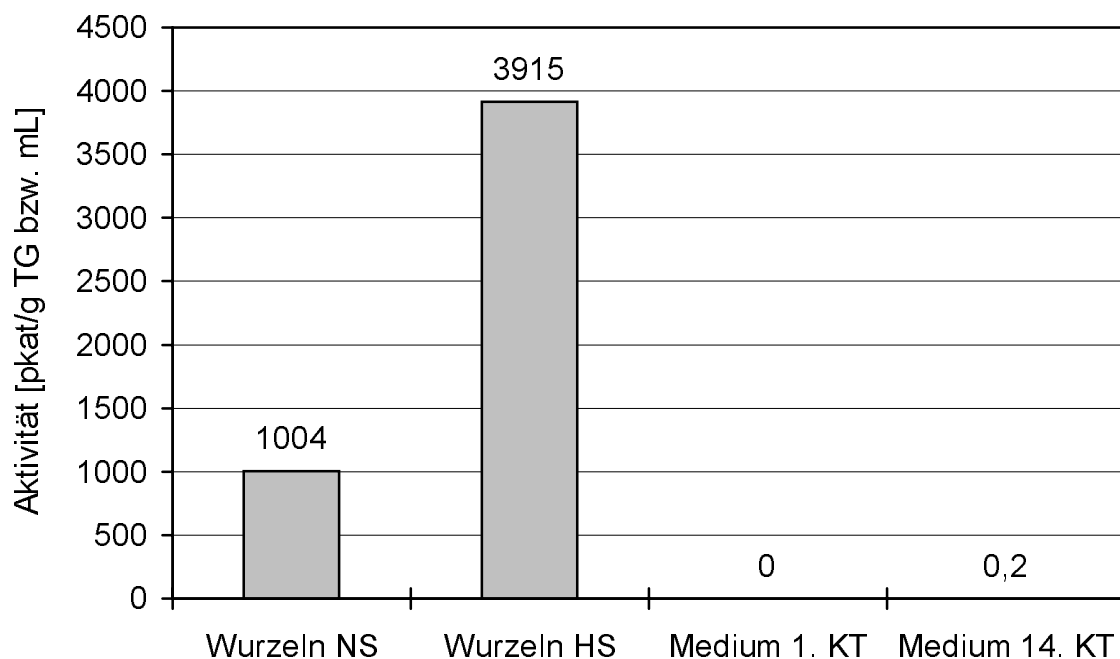


Abbildung 29: Linamaraseaktivität in Wurzeln und Medium der Wurzelflüssigkulturen von *Linum usitatissimum*

Die Linamaraseaktivität wurde mit Linamarin als Substrat im Thunberg-Gefäß bestimmt. Der Niedersalzextrakt (NS) wurde als Gesamtextrakt mit Citrat-Phosphat-Puffer (40 mmol/L, pH 5,6; 2 mmol/L Na-Ascorbat) hergestellt. Für den Hochsalzextrakt (HS) wurde der mehrfach nachextrahierte, unlösliche Homogenisationsrückstand des Gesamtextraktes mit 1 M NaCl-Lösung behandelt (siehe Kapitel 2.2.8.4). Die Konzentrierung des Enzyms aus dem Medium erfolgte in einem Centriprep-Konzentrator (Centriprep 3, Trenngrenze 3.000 D, Amicon). Dargestellt sind die Mittelwerte der Bestimmungen aus drei verschiedenen Kulturkolben nach einer Kulturdauer von 14 Tagen.

NS: Niedersalzextrakt; HS: Hochsalzextrakt; KT: Kulturtag

Auch in Wurzelkulturen von *Linum usitatissimum* wurde eine Linamaraseaktivität nachgewiesen, von der Teile mit einem hypotonischem Puffer extrahierbar waren und große Teile erst unter Hochsalzbedingungen extrahiert werden konnten (Abbildung 29). Die nachgewiesene Linamaraseaktivität verteilte sich ungleich auf

die beiden Extrakte. So konnte im hypotonischen Puffer nur 25 % der Linamarase gelöst werden, wohingegen mit dem Hochsalzextrakt 75 % extrahiert wurden. Der unter Hochsalzbedingungen extrahierte Anteil war bei den Wurzeln nicht so groß wie bei den Zellsuspensionen. Wie für die Zellkulturen wurde angenommen, dass die Wurzelkulturen zwei unterschiedliche β -Glucosidasen besitzen. Ein Enzym besitzt im Niedersalzextrakt lösliche Eigenschaften und kann mit hypotonischen Puffer extrahiert werden, während die andere β -Glucosidase erst unter Hochsalzbedingungen abgelöst werden kann. Beide Enzyme der Wurzelkulturen zeigen zu den Enzymen der Zellkulturen eine vergleichbare Aktivität, so dass auch hier die im Niedersalz lösliche Fraktion eine deutlich geringere Aktivität als die lösliche β -Glucosidase in der Leinpflanze besitzt.

Bei der Linamarase im Hochsalzextrakt kann es sich um ein apoplastisches Enzym handeln, das in vivo oder artefiziell an die Zellwand assoziiert vorliegt, oder ein symplastisches Enzym wurde während der Präparation artefaktisch an die Zellwand gebunden. Zur Klärung dieser Frage wurde die Enzymaktivität auch in dem Kulturmedium der Wurzelsuspensionen bestimmt (siehe Abbildung 29) und mit der Aktivität eines symplastischen Markerenzym verglichen (Kapitel 3.2.7.5).

Im Kulturmedium der Wurzelflüssigkultur wurde erst nach 14 Kulturtagen eine sehr geringe Linamaraseaktivität von 0,2 pkat/mL nachgewiesen. Dieses Medium beinhaltet im Gegensatz zu dem Medium der Zellsuspensionen (4 %, siehe Abbildung 28) nur zwei Prozent der β -Glucosidase, die in den Wurzeln detektiert wurde.

Die Gesamtaktivität der in den Wurzelflüssigkulturen nachgewiesenen Linamarase beträgt 5 nkat/g TG und entspricht der Aktivitäten in Zellsuspensionen von *Linum usitatissimum*.

Ergebnisse aus Kapitel 3.2.7.1: In allen untersuchten Probenmaterialien wurde Linamaraseaktivität nachgewiesen. Die Enzymaktivität in den untersuchten Pflanzenorganen entsprach der Aktivität bezogen auf die Trockenmasse, die Fan und Conn (1985) für Samen von *Linum usitatissimum* nachgewiesen haben.

Die Flüssigkulturen der Wurzeln zeigten sowohl in dem hypotonischen Puffer als auch in der Hochsalzextraktion eine nahezu gleichgroße Linamaraseaktivität wie die der Zellkulturen. In den Medien der Suspensions- und Flüssigkulturen wurden nur Spuren dieses Enzyms nachgewiesen.

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass sowohl in Leinpflanzen als auch in Zell- und Wurzelkulturen von *Linum usitatissimum* zwei β -Glucosidasen vorkommen. Während das eine im hypotonischen Puffer als lösliches Enzym extrahierbar ist, wurde das andere nur unter Hochsalzbedingungen extrahiert. Aussagen über eine Lokalisation der Enzyme können an Hand dieser Befunde nicht getroffen werden. Diese kann durch den Vergleich der Aktivitäten eines Gesamtexttraktes mit der in isolierten Protoplasten aufgeklärt werden. Deutlich wurde auch, dass die lösliche β -Glucosidaesfraktion in den Flüssigkulturen gegenüber der Leinpflanze eine stark verringerte Aktivität aufweist.

3.2.7.2 Linustatinase

Die in Samen von *Linum usitatissimum* nachgewiesene und gereinigte Linustatinase (FAN und CONN, 1985) ist eine β -Glucosidase, die spezifisch 1,6 und 1,3-Bindungen hydrolysiert. Dabei wird vom cyanogenen Substrat Linustatin die terminale Glucose hydrolytisch abgespalten, so dass als Produkte Glucose und Linamarin entstehen. Diese Hydrolyse des Linustatins zu Linamarin kann entweder den vollständigen metabolen Abbau von Linamarin einleiten, oder das gebildete Linamarin wird in der Pflanze nach einer Verlagerung als Linustatin akkumuliert.

Da die zu untersuchenden Enzymlösungen große Mengen an Linamarin spaltender Linamarase enthalten (siehe Kapitel 3.2.7.1), würde bei Aktivität einer sequentiellen Diglucosidase auch das entsprechende Monoglucosid Linamarin weiter zu Acetoncyanhydrin und Glucose gespalten werden. Zur Messung des Umsatzes von Linustatin durch die Linustatinase wurde daher die freigesetzte Glucose- und Cyanidmenge bestimmt und wie in Kapitel 2.2.8.3 beschrieben bilanziert. In allen Aktivitätstests wurde ein Verhältnis von Glucose zu Cyanid von 2:1 bestimmt. Dieses Ergebnis kann den vollständigen sequentiellen Abbau durch die Linustatinase und die Linamarase zeigen. Da die Linustatinase auch Aktivität gegenüber Gentiobiose aufweist (Fan und Conn, 1985) könnte das Auftreten von Glucose und Cyanid im Inkubationsatz auch auf die Aktivität einer simultanen

Diglucosidase zurückzuführen sein, die Linustatin zu Cyanhydrin und Gentiobiose hydrolysiert, wobei letztere weiter zu zwei Molekülen Glucose gespalten wird.

Wie im Fall der Linamarase wurden sowohl von den Pflanzenorganen als auch von den Zellsuspensionen und Wurzelflüssigkulturen Nieder- und Hochsalzextrakte erstellt und auf Linustatinaseaktivität untersucht (siehe Kapitel 2.2.8.3). Auch im Medium der Suspensionen und Flüssigkulturen von *Linum usitatissimum* wurde die Linustatinaseaktivität getestet.

In Abbildung 30 sind die Linustatinaseaktivitäten der einzelnen Organe der Leinpflanze dargestellt.

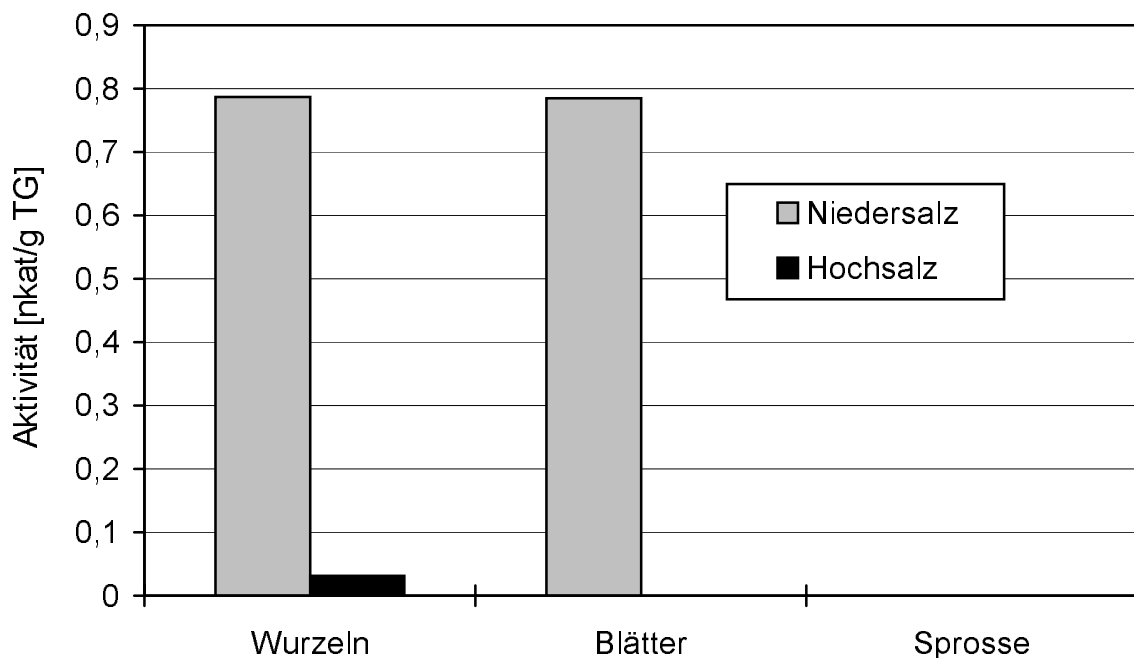


Abbildung 30: Linustatinaseaktivität in Pflanzenorganen von *Linum usitatissimum*

Die Linustatinaseaktivität wurde mit Linustatin als Substrat im Thunberg.Gefäß bestimmt. Der Niedersalzextrakt wurde als Gesamtextrakt mit Citrat-Phosphat-Puffer (40 mmol/L, pH 5,6; 2 mmol/L Na-Ascorbat) hergestellt. Für den Hochsalzextrakt wurde der mehrfach nachextrahierte, unlösliche Homogenisationsrückstand des Gesamtextraktes mit 1 M NaCl-Lösung behandelt (siehe Kapitel 2.2.8.3). Dargestellt sind die Mittelwerte aus den Bestimmungen für drei verschiedene Pflanzen.

Die Aktivität einer Linustatin spaltenden β -Glucosidase wurde nur in den Blättern und den Wurzeln der Leinpflanzen detektiert, wohingegen die Sprosse keine Linustatinaseaktivität enthielten. Die nachgewiesene Enzymaktivität der Blätter und Wurzeln war nahezu gleich groß und betrug 0,8 nkat/g TG. Damit zeigte die

Linustatin spaltende β -Glucosidase eine 80-fach geringere Aktivität als die in allen Pflanzenorganen bestimmte Linamarase. Besonders interessant ist die Tatsache, dass in den Wurzeln, die nur wenig cyanogene Glycoside enthalten, die Linustatinaseaktivität vergleichsweise hoch ist.

Wie auch die Linamarase wurde die Linustatinase fast vollständig mit einem hypotonischen Puffer extrahiert. Unter Hochsalzbedingungen waren nur noch Spuren des Enzyms nachzuweisen.

Die in den Blättern und Wurzeln vorkommende Linustatinaseaktivität zeigte damit die gleichen Eigenschaften, wie das in Leinsamen beschriebene Enzym (FAN UND CONN, 1985), das mit Hilfe eines 0,1 mol/L Natriumacetatpuffers extrahiert worden war.

In Abbildung 31 sind die Linustatinaseaktivitäten der Zellsuspensionskulturen dargestellt.

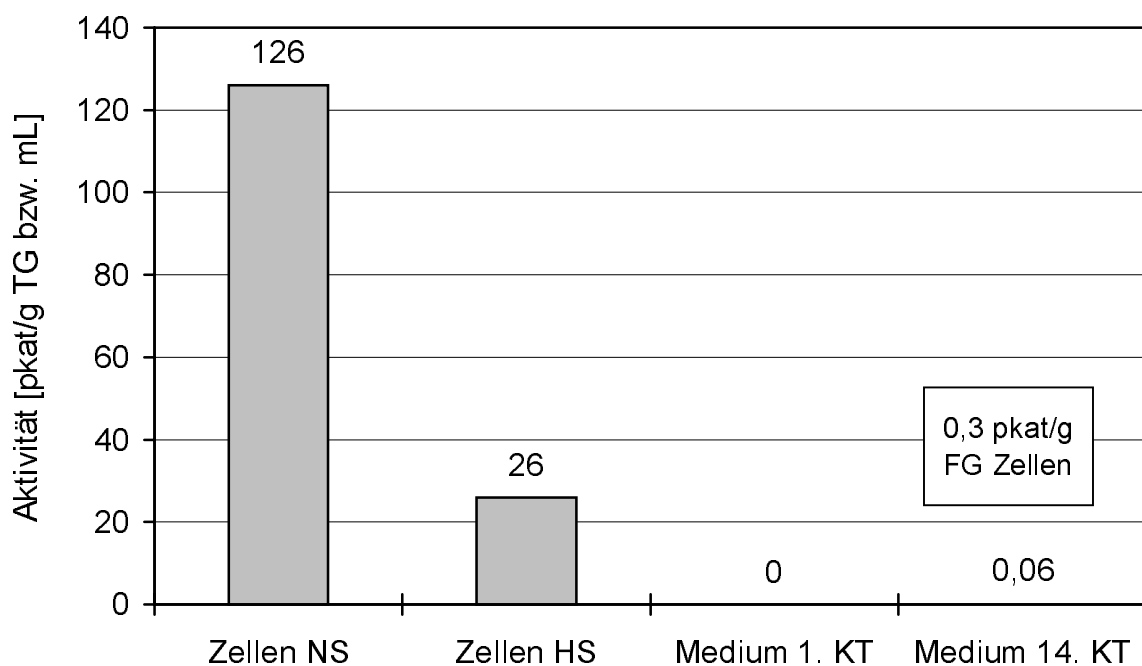


Abbildung 31: Linustatinaseaktivität in Zellen und Medium der Zellsuspensionskultur von *Linum usitatissimum*

Die Linustatinaseaktivität wurde mit Linustatin als Substrat im Thunberg-Gefäß bestimmt. Der Niedersalzextrakt (NS) wurde als Gesamtextrakt mit Citrat-Phosphat-Puffer (40 mmol/L, pH 5,6; 2 mmol/L Na-Ascorbat) hergestellt. Für den Hochsalzextrakt (HS) wurde der mehrfach nachextrahierte, unlösliche Homogenisationsrückstand des Gesamtextraktes mit 1 M NaCl-Lösung behandelt (siehe Kapitel 2.2.8.3). Die Konzentrierung des Enzyms aus dem Medium erfolgte in einem Centriprep-Konzentrator (Centriprep 3, Trenngrenze 3.000 D, Amicon). Dargestellt sind die Mittelwerte der Bestimmungen aus drei verschiedenen Kulturkolben nach einer Kulturdauer von 14 Tagen.

NS: Niedersalzextrakt; HS: Hochsalzextrakt; KT: Kulturtage

In den Zellen der Zellsuspensionskulturen wurde sowohl in der Nieder- als auch in der Hochsalzfraktion eine Linustatin spaltende β -Glucosidase nachgewiesen (siehe Abbildung 31). Die Linustatinaseaktivität verteilte sich zu 80 % auf den hypotonischen Puffer und nur zu 20 % auf den Hochsalzextrakt.

Auch für die Linustatinaseaktivität kann vermutet werden, dass mehrere Enzyme existieren, die gegenüber den Extraktionsbedingungen unterschiedliche Eigenschaften haben. Ein Enzym ist, wie das Enzym in Leinsamen (FAN UND CONN, 1985), im Niedersalzextrakt löslich und wurde mit Hilfe eines hypotonischen Puffers (40 mM Phosphat-/Citrat-Puffer) extrahiert. Das andere Enzym kann erst unter Einsatz einer hohen Salzkonzentration extrahiert werden.

Die Untersuchung des Kulturmediums zeigte auch nach 14 Kulturtagen nur eine sehr geringe Linustatinaseaktivität von 0,06 pkat/mL Medium (3 % der Gesamtaktivität, siehe Abbildung 31). Diese im Medium nachgewiesene Aktivität wurde sehr wahrscheinlich durch ein symplastisches Enzym hervorgerufen, das auf Grund von Verletzungen der Zellen im Medium vorlag. Die Inkubation intakter Zellen mit Linustatin und die Untersuchung ob während dieser Inkubation Blausäure freigesetzt wird (siehe Kapitel 3.2.9), sowie die Untersuchungen an isolierten Protoplasten (Kapitel 3.2.8), haben diese Frage der Lokalisation eindeutiger geklärt. Untersuchungen des Mediums auf das Vorkommen eines Markerenzym haben diese Aussage ebenfalls bestätigt (siehe Kapitel 3.2.7.5).

Die Gesamtaktivität der Linamarase in den Zellsuspensionskulturen war 35-fach so hoch wie die Aktivität der Linustatin spaltenden β -Glucosidase.

In Abbildung 32 sind die Linustatinaseaktivitäten der Wurzelflüssigkulturen dargestellt.

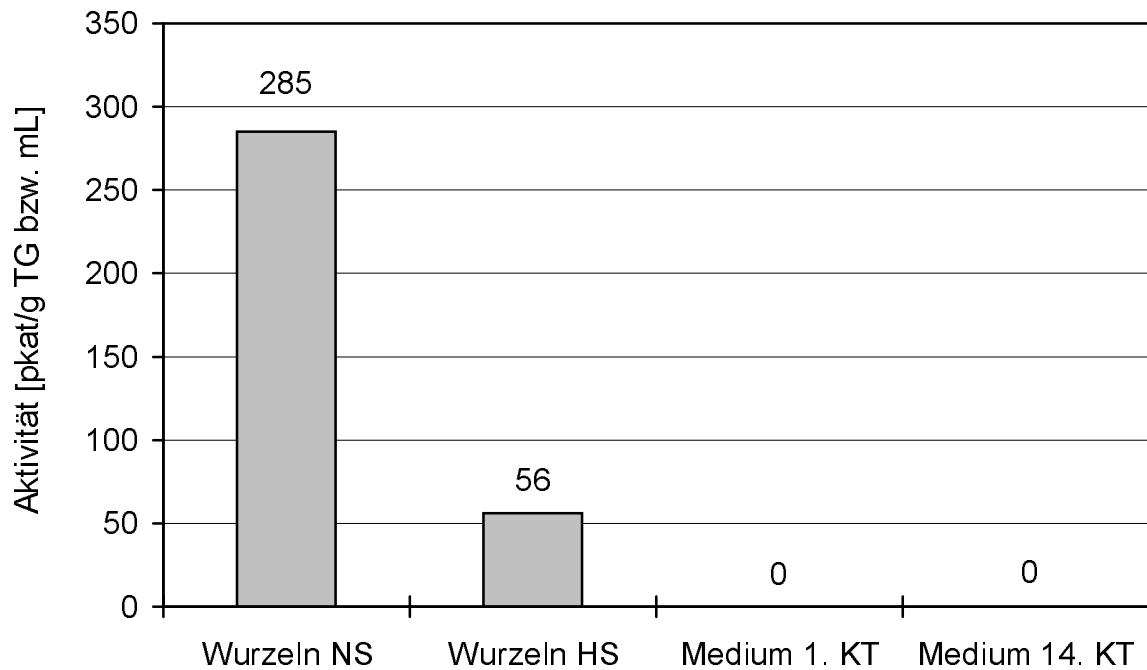


Abbildung 32: Linustatinaseaktivität in Wurzeln und Medium der Flüssigkulturen von *Linum usitatissimum*

Die Linustatinaseaktivität wurde mit Linustatin als Substrat im Thunberg-Gefäß bestimmt. Der Niedersalzextrakt (NS) wurde als Gesamtextrakt mit Citrat-Phosphat-Puffer (40 mmol/L, pH 5,6; 2 mmol/L Na-Ascorbat) hergestellt. Für den Hochsalzextrakt (HS) wurde der mehrfach nachextrahierte, unlösliche Homogenisationsrückstand des Gesamtextraktes mit 1 M NaCl-Lösung behandelt (siehe Kapitel 2.2.8.3). Die Konzentrierung des Enzyms aus dem Medium erfolgte in einem Centriprep-Konzentrator (Centriprep 3, Trenngrenze 3.000 D, Amicon). Dargestellt sind die Mittelwerte der Bestimmungen aus drei verschiedenen Kulturkolben nach einer Kulturdauer von 14 Tagen.

NS: Niedersalzextrakt; HS: Hochsalzextrakt; KT: Kulturtage

In Wurzelkulturen von *Linum usitatissimum* wurde ebenfalls eine Linustatinaseaktivität nachgewiesen, dabei konnte ein großer Teil der Aktivität mit einem hypotonischem Puffer und der Rest nur mit einem Hochsalzpuffer extrahiert werden (siehe Abbildung 32). Die Verteilung der Enzymaktivität auf diese beiden Extraktionsmedien war sehr unterschiedlich. So wurden im Niedersalzextrakt 80% der Enzymaktivität und im Hochsalzextrakt nur 20 % der Aktivität detektiert. Für die Linustatinase in den Wurzeln kann ebenfalls die Existenz zweier Enzyme vermutet werden wie für die Aktivität in den Zellsuspensionskulturen. Über die Lokalisation dieser Enzyme kann auf Grund dieser Untersuchungen keine Aussage getroffen werden.

Im Kulturmedium der Wurzelflüssigkulturen wurde auch nach 14 Kulturtagen keine Linustatinase nachgewiesen.

Die Gesamtkaktivität der in den Wurzelflüssigkulturen nachgewiesenen Linustatinase beträgt 341 pkat/g TG und entspricht in Höhe und Verteilung der Größenordnung der Aktivität der Zellsuspensionen von *Linum usitatissimum*.

Ein Vergleich der Linustatinaseaktivität in allen untersuchten Fraktionen führte **zusammenfassend** zu folgenden Ergebnissen: In den Wurzeln und Blättern der Leinpflanze wurde wie in den Zellen und Wurzeln der Suspensions- bzw. Flüssigkulturen die Aktivität einer Linustatin hydrolysierenden Linustatinase detektiert. Die Wurzeln und Zellen der Suspensions- und Flüssigkulturen zeigten eine nahezu gleich große Linustatinaseaktivität, die zehnfach geringer ausfiel als die der Wurzeln und Sprosse. In den Medien der Suspensions- und Flüssigkulturen wurden keine Linustatinase nachgewiesen.

Das Verhältnis von Linamarase- zu Linustatinaseaktivität in den Zell- und Wurzelflüssigkulturen entsprach den in Pflanzen beobachteten Enzymaktivitäten. Alle untersuchten Proben wiesen eine höhere Linamarase- als Linustatinaseaktivität auf. Die Gesamtkaktivität der Linamarase und der Linustatinase in den Zell- und den Wurzelkulturen war gleich groß, lag aber 10-fach unter der in Pflanzen bestimmten Aktivitäten.

3.2.7.3 β -Cyanoalaninsynthase

Da in den Zellsuspensionen und Wurzelflüssigkulturen in den ersten 10 Kulturtagen große Mengen cyanogener Glucoside metabolisiert wurden, ohne dass Blausäure an die Umgebung abgegeben wurde, müssen in den Suspensions- und Flüssigkulturen blausäurefixierende Enzyme enthalten sein (siehe Kapitel 3.2.7). Für Pflanzen sind zwei Enzyme beschrieben, die Blausäure fixieren: Rhodanase und β -Cyanoalaninsynthase. Die Zell- und Wurzelkulturen sowie die Kulturmedien wurden auf das Vorkommen beider Enzyme getestet. Die Untersuchungen wurden zum Vergleich auf die Pflanzenorgane ausgedehnt.

Die in Pflanzen bestimmten β -Cyanoalaninsynthaseaktivitäten sind in Abbildung 33 dargestellt.

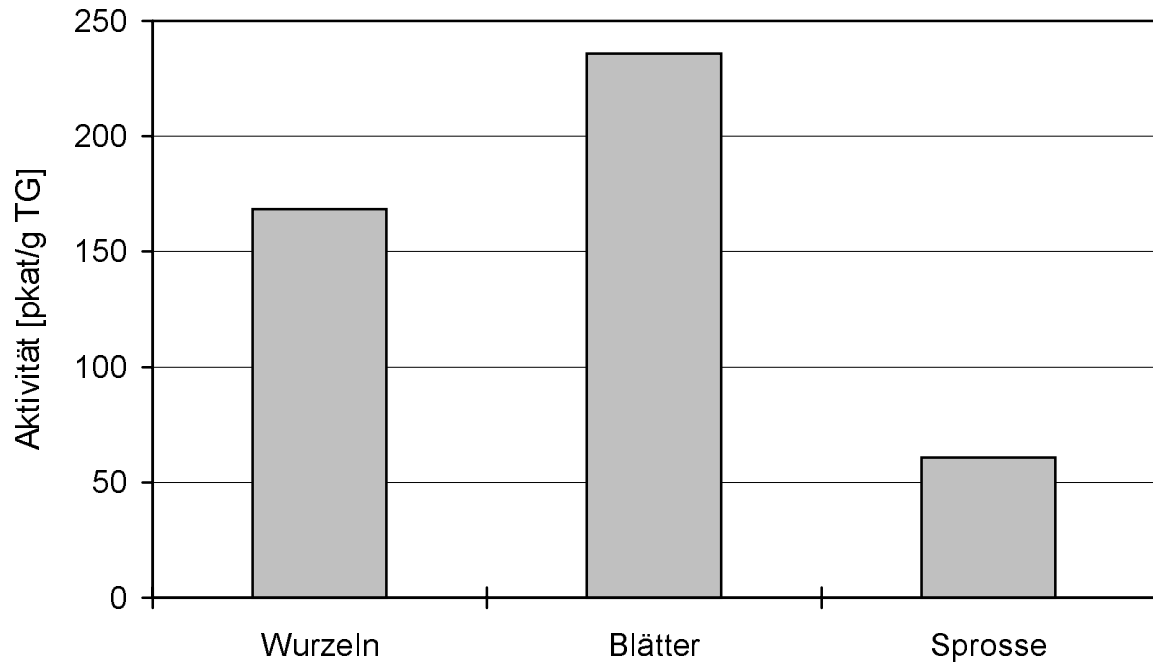


Abbildung 33: β -Cyanoalansynthaseaktivität in Wurzeln, Blättern und Sprossen von Leinpflanzen

Die β -Cyanoalansynthaseaktivität wurde nach einer Methode von Blumenthal (1963) bestimmt. Das Enzym wurde mit einem TRIS/HCl-Puffer (0,2 M; pH 8,2; 2 mmol/L Na-Ascorbat) extrahiert (siehe Kapitel 2.2.8.3). Dargestellt sind die Mittelwerte aus den Bestimmungen für drei verschiedene Pflanzen.

Die blausäurefixierende β -Cyanoalaninsynthase wurde in allen drei Organen der Leinpflanze nachgewiesen. Dabei zeigten die Blätter die höchste Aktivität, wohingegen in den Sprossen von *Linum usitatissimum* eine fünffach geringere Aktivität als in den Blättern gefunden wurde.

Die Aktivität der β -Cyanolaninsynthase, die in den Organen der Leinpflanze bestimmt wurde, lag zwischen 60 und 230 $\mu\text{kat/g TG}$ und war 30- bis 100-fach niedriger als die von Sagasser (1996) in 30 Tage alten Samen von *Linum usitatissimum* nachgewiesene Enzymaktivität. Die für Leinorgane ermittelten β -Cas-Konzentrationen lagen in der gleichen Größenordnung, wie die Werte, die von Miller und Conn (1980) für die oberirdischen Teile sechs Tage alter Leinkeimlinge beschrieben wurden.

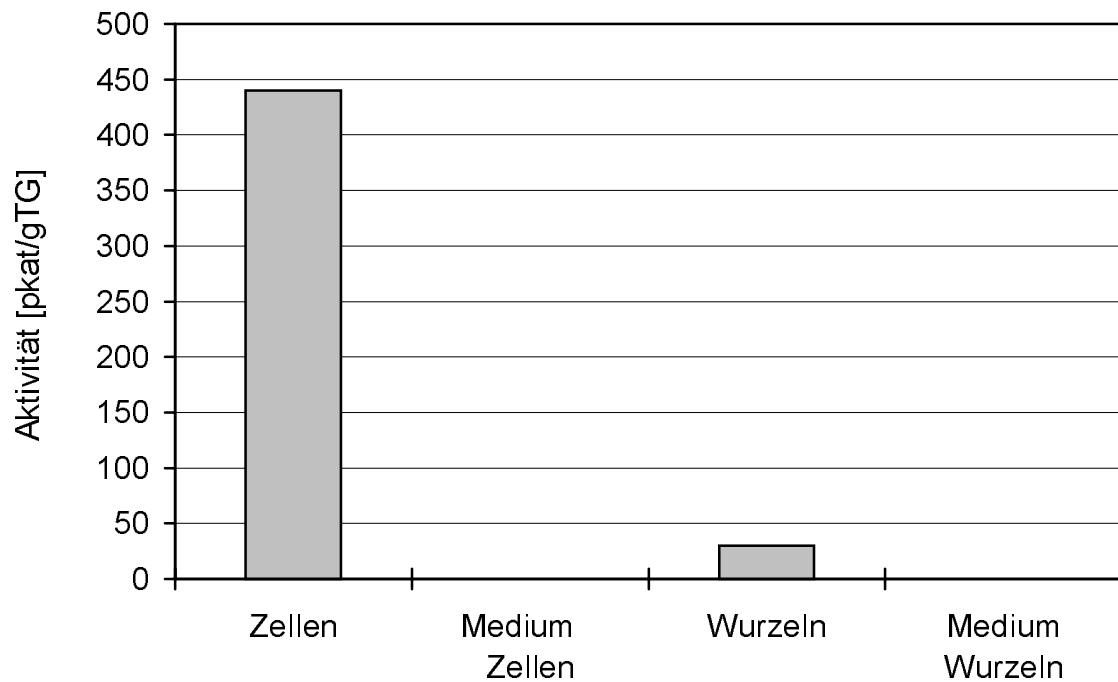


Abbildung 34: β -Cyanoalansynthaseaktivität in Wurzelflüssigkulturen, Zellkulturen von *Linum usitatissimum* und deren Medien

Die β -Cyanoalansynthaseaktivität wurde nach einer Methode von Blumenthal (1963) bestimmt. Das Enzym wurde mit einem TRIS/HCl-Puffer (0,2 M; pH 8,2; 2 mmol/L Na-Ascorbat) extrahiert (siehe Kapitel 2.2.8.3). Die Konzentrierung des Enzyms aus dem Medium erfolgte in einem Centriprep-Konzentrator (Centriprep 3, Trenngrenze 3.000 D, Amicon). Dargestellt sind die Mittelwerte aus den Bestimmungen für drei verschiedene Kulturkolben.

KT: Kulturtag

Auch in den Zellen und Wurzeln der Suspensions- und Flüssigkulturen von *Linum usitatissimum* wurde die Aktivität einer β -Cyanoalaninsynthase nachgewiesen. Die Aktivität dieses Enzyms war in Zellkulturen wesentlich größer als in Wurzelkulturen und überstieg auch die Aktivität in den Blättern der Leinpflanzen um das Doppelte.

Da im Medium der Suspensionen und Flüssigkulturen keine β -Cyanoalaninsynthase detektiert wurde, handelt es sich sehr wahrscheinlich um ein symplastisches Enzym.

Bei der Keimlingsentwicklung von *Hevea brasiliensis* konnte gezeigt werden, dass die stärkste *in vivo*-Metabolisierung der Cyanglucoside in den Organen mit der höchsten β -CAS-Konzentration erfolgte (SELMAR et al., 1988; UMBACH, 1989). In Leinpflanzen lag die β -CAS-Konzentration in den Samen ca. 30- bis 100- fach höher als in den übrigen Organen. Daher konnte davon ausgegangen werden,

dass dort die stärkste Umsetzung erfolgte. So wie auch die höhere Konzentration des Enzyms in den Zellsuspensionen gegenüber den Wurzelflüssigkulturen darauf hindeutet, dass in den Zellkulturen eine stärkere Metabolisierung von Cyanglucosiden stattfindet als in den Wurzelkulturen.

3.2.7.4 Rhodanase

Die zu Bestimmung der Rhodanase genutzte Thiocyanatbildung findet in pflanzlichen Homogenaten auch spontan oder auf dem Wege nicht-enzymatischer Katalyse statt. Daher muß die im Inkubationsansatz gemessene Extinktion immer mit der eines Blindwertes verglichen werden, der diese spontane SCN-Bildung repräsentiert.



In keiner der untersuchten Fraktionen wurde eine Rhodanaseaktivität nachgewiesen. Weder in den Organen der Leinpflanze, noch in den Wurzelflüssigkulturen oder Zellsuspensionskulturen. Auch die untersuchten Medien der Flüssig- und Suspensionskulturen zeigten keine Rhodanaseaktivität.

Diese Daten bestätigen die Ergebnisse von Miller und Conn (1980), die verschiedene cyanogene und nicht-cyanogene Pflanzen auf das Vorkommen von Rhodanase untersuchten und in sechs Tage alten Leinkeimlingen keine Rhodanase fanden.

Auch bei vielen anderen Pflanzen konnte nur ein sehr geringer Anteil des *in vivo*-Test bestimmten Thiocyanates auf eine enzymatisch katalysierte Bildung zurückgeführt werden (KAKES & HAKVOORT, 1992). Diese Autoren diskutierten daher, ob eine Rhodanase in Pflanzen überhaupt vorkommt.

3.2.7.5 NADH:Malatdehydrogenase (MDH) als Marker symplastischer Enzyme

Um abschätzen zu können, welcher Anteil der im Medium nachweisbaren Linamarase- und Linustatinaseaktivität möglicherweise auf eine Kontamination

durch symplastische Enzyme (bedingt durch eine Verletzung der Zellen), zurückzuführen war, wurden Studien mit Markerenzymen durchgeführt. Als typisches symplastisches Enzym wurde die NADH:Malatdehydrogenase (MDH) untersucht, die in nahezu allen Kompartimenten der Zelle vorhanden ist.

Diese Untersuchungen sollten helfen zu klären, ob die an die Zellwand assoziierte Linamarase in Zell- und Wurzelkulturen analog der Linamarase in vielen anderen Pflanzen (*Lotus corniculatus*: RISSLER & MILLAR, 1977; *Trifolium repens*: KAKES, 1985; *Hevea brasiliensis*: KURZHALS ET AL., 1989; *Manihot esculenta*: MKPONG ET AL., 1990) teilweise im Zellwandbereich lokalisiert ist. Auch die Lokalisation der Linustatinase, die unter Hochsalzbedingungen extrahiert wurde, sollte geklärt werden. Eine apoplastisch vorkommende Linustatinase wurde in der Literatur noch nicht beschrieben, dahingegen konnte Hillmar (1999) für *Hevea brasiliensis* und Warnecke (1995) für *Manihot esculenta* eine präparationsbedingte artifizielle Bindung einer symplastischen Linustatinase an die Zellwand beobachten.

Tabelle 9: Aktivität der NADH:Malatdehydrogenase in Zellen und Medium der Zellsuspensionskulturen aus *Linum usitatissimum*

Basierend auf der Bildung von L-Malat aus Oxalacetat, unter Oxidation des Cosubstrates NADH, wurde die MDH-Aktivität über den optischen Test photometrisch bestimmt (siehe Kapitel 2.2.8.5). Die Konzentrierung des Enzyms im Medium erfolgte mit Centriprep-Konzentratoren. Die Extraktion der MDH erfolgte mit MC-Ilvaine-Puffer (40 mmol/L, pH 5,6). Die Zellsuspensionskulturen wurden für die Bestimmungen der MDH-Aktivität 14 Tage nach der Inokulation geerntet. Angegeben sind Mittelwerte aus zwei Bestimmungen von jeweils zwei verschiedene Kulturkolben. Dargestellt ist die Aktivität in nkat/g TG und in Prozent, wobei die Aktivität in den Zellen gleich 100 % gesetzt wurde.

| Enzymlösung | MDH-Aktivität [nkat/g TG] | MDH-Aktivität [%] |
|-------------|---------------------------|-------------------|
| Medium | 12,9 | 2,8 |
| Zellen | 464,2 | 100,0 |

Die sehr niedrigen Aktivitäten der NADH:Malatdehydrogenase im Medium zeigen, dass bei der Trennung des Zellmaterials vom Medium nur wenige Zellen verletzt wurden und nur ein geringer Anteil der Zellen abgestorben war (siehe Tabelle 9).

In den Zellen der Suspensionskulturen wurden ca. 500 nkat/g TG Malatdehydrogenase-Aktivität detektiert, diese Aktivität liegt in der gleichen Größenordnung wie die in Maniok Zellkulturen beschriebenen Konzentrationen an MDH (HEIDBREDE, 1999). Auf eine Differenzierung der Aktivität zwischen Nieder- und Hochsalzextrakt, wie sie für Linamarase erfolgte, wurde verzichtet, da die MDH im Symplasma vorliegt und eine Affinität zur Zellwand nicht besteht.

Tabelle 10: Vergleich der Aktivitäten von NADH:Malatdehydrogenase, Linustatinase und Linamarase im Kulturmedium der Zellsuspensionskulturen

Die Gesamtaktivitäten (100 %) entsprechen der Summe aller Enzym-Aktivitäten aus dem Medium und den Zellextrakten.

| Linustatinase-Aktivität [%] | Linamarase-Aktivität [%] | MDH-Aktivität [%] |
|-----------------------------|--------------------------|-------------------|
| 3,0 | 4,2 | 2,8 |

Da maximal der Anteil an Linamarase im Medium aus dem Symplasten stammen konnte, der auch an MDH im Medium nachgewiesen wurde, stammten höchstens 2,8 % der Linamarasaktivität im Medium aus verletzten Zellen. Im Medium der Zellsuspensionskulturen wurde mit 4,2 % ungefähr genauso viel Linamaraseaktivität nachgewiesen. Ein Vergleich der prozentualen Anteile der Aktivitäten der linamarinspaltenden β -Glucosidase und der Malatdehydrogenase (siehe Tabelle 10) macht deutlich, dass die Linamarase mit dem gleichen Prozentsatz im Medium vorkam wie die NADH:Malatdehydrogenase. Dies ist ein erster Hinweis, dass die Linamaraseaktivität in den Zellkulturen im Gegensatz zu dem Enzym vieler anderer Pflanzen symplastisch vorliegt. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass sich zufällig der gleiche Anteil einer apoplastischen β -Glucosidase von der Zellwand gelöst hat wie MDH aus zerstörten Zellen ins Medium diffundiert ist.

Für die Linustatinase zeigte sich ein ähnliches Ergebnis, auch sie wurde nur zu dem Anteil im Medium detektiert (3,0 %), der an NADH:Malatdehydrogenase bestimmt wurde. Damit kann auch für die Linustatinase eine symplastische Lokalisation vermutet werden. Diese Vermutung wird durch die Literatur

unterstützt in der alle beschriebenen Linustatinasen als symplastisch lokalisiert beschrieben werden (HILLMAR, 1999; SELMAR, 1993a).

Nach einem Kulturtag wurde im Kulturmedium keine Linustatinase detektiert, da zu diesem Zeitpunkt die Zellmasse um das 10-fache geringer war als nach 14 Tagen und die aus dem Anteil zerstörter Zellen frei werdende Linustatinase unterhalb der Nachweisgrenze lag.

Die Ergebnisse des **Kapitels 3.2.7** lassen sich wie folgt zusammenfassen:

In fast allen untersuchten Pflanzenteilen wurde sowohl Linamarase- als auch eine Linustatinaseaktivität nachgewiesen. Lediglich im Spross war keine Linustatinase vorhanden.

Die Flüssigkulturen der Wurzeln zeigten eine nahezu gleich große Linamaraseaktivität bzw. Linustatinaseaktivität wie die der Zellsuspensionskulturen. Die Linustatinaseaktivität ist dabei um den Faktor 10 kleiner als die Aktivität der Linamarase in diesen Kulturen. In den Medien der Flüssigkulturen wurden nur Spuren dieser Enzyme nachgewiesen. Wie ein Vergleich der prozentualen Anteile der Aktivitäten von Linamarin und Linustatin spaltender β -Glucosidase mit der Malatdehydrogenase (siehe Tabelle 10) vermuten läßt, waren die Aktivitäten im Medium auf eine Verletzung der Zellen zurückzuführen. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass sich zufällig der gleiche Anteil einer apoplastischen β -Glucosidase von der Zellwand gelöst hat wie MDH aus zerstörten Zellen ins Medium diffundiert ist.

Während der größte Anteil der Linamaraseaktivität in den einzelnen Pflanzenorganen durch einen hypotonischen Puffer extrahiert werden konnte, mußte der größte Teil der Enzymaktivität aus den Zellen und Wurzeln der Flüssigkulturen unter Zugabe von 1,2 M Kochsalz zum Extraktionspuffer von der Zellwand abgelöst werden. Daher wurde angenommen, dass in den Zell- und Wurzelkulturen mehrere β -Glucosidasen vorkommen. Eines dieser Enzyme kann unter hypotonischen Bedingungen extrahiert werden. Seine Aktivität ist in den Zell- und Wurzelkulturen gegenüber der Aktivität in der Leinpflanze stark

reduziert. Das andere Enzym zeigt eine starke Assoziation an die Zellwand und wurde wie im Fall der vegetativen Leinorgane erst unter Hochsalzbedingungen abgelöst. Die Höhe der Aktivität dieser Enzyme in der Zell- und Wurzelkultur ist vergleichbar mit der aus den Leinorganen. Auch für die Leinpflanze wird daher vermutet, dass zwei β -Glucosidasen vorkommen, die unterschiedliche Extraktionseigenschaften zeigen.

Die Linustatinaseaktivität zeigt ein ähnliches Verhalten gegenüber den Extraktionsbedingungen, so dass für dieses Enzym die gleiche Vermutung angestellt werden kann wie für die Linamarase.

Das Verhältnis von Linamarase- zu Linustatinaseaktivität in den Zellsuspensionen und Wurzelflüssigkulturen entsprach den in Pflanzen beobachteten Verhältnissen. Alle untersuchten Proben wiesen eine höhere Linamarase- als Linustatinaseaktivität auf. Die Gesamtkaktivität der Linamarase und der Linustatinase in den Zell und den Wurzelkulturen war gleich groß, lag aber 10-fach unter der in Pflanzen bestimmten Aktivität.

Die Blausäure fixierende β -Cyanoalaninsynthase wurde in allen drei Organen der Leinpflanze nachgewiesen. Dabei zeigten die Blätter die höchste Aktivität, wohingegen die Sprosse von *Linum usitatissimum* nur eine fünffach geringere Aktivität besaßen.

Auch in den Zellen und Wurzeln der Flüssigkulturen von *Linum usitatissimum* wurde die Aktivität einer β -Cyanoalaninsynthase nachgewiesen. Die Aktivität dieses Enzyms war in Zellen wesentlich größer als in Wurzeln. Dennoch lagen die Enzymaktivitäten aller untersuchter Fraktionen in der gleichen Größenordnung.

In keiner der untersuchten Fraktionen wurde eine Rhodanaseaktivität detektiert. Weder in den Organen der Leinpflanze, noch in den Wurzelflüssigkulturen oder Zellsuspensionen. Auch die untersuchten Medien der Flüssig- und Suspensionskulturen zeigten keine Rhodanaseaktivität. Diese Daten bestätigen die Ergebnisse von Miller und Conn (1890), die verschiedene cyanogene und

nicht-cyanogene Pflanzen auf das Vorkommen von Rhodanase untersuchten und auch in sechs Tage alten Leinkeimlingen keine Rhodanase fanden.

3.2.8 Lokalisierung der Linamarase und Linustatinase auf zellulärem Niveau

Die Experimente zur Bestimmung der Linamarase und der Linustatinase unter Nieder- und Hochsalzbedingungen konnten nicht eindeutig klären, ob die Enzyme *in vivo* symplastisch oder apoplastisch vorliegen. Auch die Untersuchungen mit einem symplastischen Markerenzym erbrachten keine vollständige Klärung. Daher wurde erneut die Aktivität der beiden β -Glucosidasen in der Zellsuspension bestimmt und auf die darin vorkommende symplastische Malatdehydrogenase bezogen. Anschließend wurden diese Enzymaktivitäten mit denjenigen verglichen, die in vollständig protoplastierten Zellen vorhanden waren. Aus der Differenz der Enzymaktivitäten von Protoplasten- und Gesamtzellfraktion konnte ersehen werden, ob die Linamarin und auch die Linustatin spaltende β -Glucosidase vollständig oder teilweise im extraplasmatischen Raum vorlag.

3.2.8.1 Isolation vitaler Protoplasten aus Zellsuspensionskulturen

Zur zweifelsfreien Lokalisierung der Linamarase- und Linustatinaseaktivität im Symplasten der Zellen einer Zellsuspensionskultur von *Linum usitatissimum* war es unabdingbar, zunächst intakte Protoplasten in möglichst großer Zahl aus den Einzelzellen und kleinen Zellaggregaten zu isolieren. Die Zellkulturen bieten dabei im Gegensatz zu ganzen Geweben den Vorteil, dass alle Zellen in ihrem Aufbau und ihren physiologischen Eigenschaften identisch sind und keine histologischen Unterschiede zu berücksichtigen sind.

Nach der Präparation mußten die Protoplasten vollständig von Geweberesten und extrazellulären Bestandteilen befreit werden, um eine Kontamination durch an die Zellwand assoziierte Enzyme zu vermeiden.

Mit dem in Kapitel 2.2.8.1.3 beschriebenen Isolationsmedium gelang es die Zellen der Zellsuspensionskultur vollständig zu Protoplasten abzdauen. Da eine vollständige Lysis der kleineren und größeren Aggregate viele Stunden dauerte und die Protoplasten während der Lysation an Vitalität verlieren (WAGNER, 1987), wurden die Zellen nur solange mazeriert, bis eine für die Bilanzierung der Enzyme

ausreichende Anzahl an Protoplasten vorlag. So wurden $0,25 \times 10^6$ bis 2×10^6 intakte Protoplasten pro Gramm Frischgewicht isoliert.

Die lichtmikroskopische Kontrolle mit Neutralrot und die Fluoresceindiacetatfärbung bestätigten die Vitalität der Protoplastenfraktion. Die Protoplasten waren in der Lage, das in die Zellen aufgenommene Fluoresceindiacetat zu hydrolysieren und das Spaltprodukt im Protoplasten zu akkumulieren, was auf die Integrität des Plasmalemmas hinwies (ADAMON et al., 1980). Ein weiterer Hinweis auf die Intaktheit der Zellen ohne Zellwand war die Tatsache, dass die intrazelluläre NADH:Malatdehydrogenase vor der Osmolyse der Protoplasten nicht im Medium dieser Fraktion nachgewiesen wurde.

Nach erfolgter Mazeration war es notwendig die Protoplasten vollständig von den hydrolytischen Enzymen des Isolationsmediums (Cellulase, Mazerozym) zu befreien, da auch sie gegenüber den Substraten der Linamarase und Linustatinase aktiv waren (KURZHALS, 1992). Die Bestimmungen der Linamarase und Linustatinase haben gezeigt, dass ein Teil dieser Enzyme nach der Homogenisation an der Zellwand assoziiert sind. Da auch während der Protoplastierung Zellen zerstört werden, kann auch auf diese Weise Linamarase artifiziell an die Zellwand gebunden werden. Daher war es erforderlich die gesamten Zellwandreste zu entfernen. Für den osmotischen Aufbruch der Protoplasten wurden nur Fraktionen eingesetzt, die zuvor als intakte Protoplasten keine hydrolytische Aktivität gegenüber Linamarin und Linustatin im Medium zeigten.

Eine vollständige Reinigung der isolierten Protoplasten wurde erreicht, indem die Protoplasten mehrere Male über einen Stufengradienten mit Ficoll im Isolationsmedium zentrifugiert wurden. Abschließend wurden die so von hydrolytischen Enzymen befreiten Protoplasten auf einer 15 %igen Ficolllösung sedimentiert.

3.2.8.2 Lokalisierung der Linamarase und Linustatinase in Zellsuspensionen

In Pflanzen von *Hevea brasiliensis* kommt im apoplastischen Raum eine Linamarin spaltende β -Glucosidase vor, wohingegen das cyanogene Diglucosid Linustatin von diesem Enzym nicht gespalten wird und den Apoplasten

ungehindert passieren kann. Linustatin stellt daher in dem von Selmar für *Hevea brasiliensis* formulierten Stoffwechselweg einen Transportmetabolit dar (SELMAR, 1986). Auch für den Stoffwechsel der Cyanglucoside in *Linum usitatissimum* wurde die Gültigkeit dieses Transportweges postuliert (SELMAR, 1992). Da die Linamarin spaltende β -Glucosidase des Leins nur das Monoglucosid hydrolysiert, nicht aber das korrespondierende Diglucosid, das durch den Apoplasten verlagert werden kann (KURZHALS et al., 1989).

Die Lokalisierung einer entsprechenden Glucosidase in den Zellkulturen ist Voraussetzung für die Aufklärung, ob der „Linustatin-Weg“ auch in Zellsuspensionskulturen von *Linum usitatissimum* Gültigkeit hat. Die Klärung der Frage, ob im Apoplasten von Lein-Zellkulturen ein Linustatin spaltendes Enzym vorkommt, ist darüber hinaus wichtig für die Applikation von cyanogenen Glucosiden in das Medium der Zellsuspensionskulturen um eine mögliche Aufnahme zu beschreiben.

Daher wurde die Aktivität der Linamarase und Linustatinase in Protoplasten und ganzen Zellen bestimmt und auf die im Symplasten vorkommende Malatdehydrogenase-Aktivität bezogen, so dass die Verteilung der Enzyme bestimmt werden konnte.

Tabelle 11: Aktivitäten der Linamarase und Linustatinase in ganzen Zellen und Protoplasten der Zellsuspensionskulturen

Die Aktivitätsbestimmungen der Linamarase und Linustatinase erfolgten nach den Angaben in Kapitel 2.2.8.2 und 2.2.8.3. Das Enzym wurde mit einem Mc Ilvaine-Puffer (40 mmol/L, pH 5,6; 2 mmol/L Na-Ascorbat) bzw. diesem Puffer, der 1,2 M Kochsalz enthält, aus den Zellen extrahiert. Die Protoplasten wurden, wie in Kapitel 2.2.8.1.3 beschrieben, isoliert. Nachdem nachgewiesen wurde, dass an der intakten Protoplastenfraction von außen keine Linamarase oder Linustatinase anhaftet, wurden die Protoplasten osmotisch geschockt und für die Aktivitätsbestimmungen, wie in Kapitel 2.2.8.2 und 2.2.8.3 beschrieben, eingesetzt. MDH: NADH:Malatdehydrogenase.

| | Protoplastenfraction [nkat/2,1 X 10 ⁶ Zellen] | Protoplasten normiert auf MDH [nkat/9,4 X 10 ⁶ Zellen] | Gesamtzellfraction [nkat/g FG] |
|---------------|---|---|-----------------------------------|
| Linamarase | 0,104 | 0,466 | 0,497 |
| Linustatinase | 0,004 | 0,0179 | 0,0152 |
| Markerenzym | | | |
| MDH | 10,35 | 46,4 | 46,4 |

Bei der Messung der Linamarase- und Linustatinaseaktivität in mehreren Protoplastenfraktionen, die von unterschiedlichen Kulturkolben stammten und nach optischen Kriterien vital und homogen waren, wurde Spaltungsaktivität von 0,0179 nkat/($9,4 \times 10^6$ Protoplasten) gegenüber Linustatin und 0.466 nkat/($9,4 \times 10^6$ Protoplasten) gegenüber Linamarin bestimmt. Diese Aktivitäten entsprechen 113 % der Linustatinase und 94 % der Linamaraseaktivität, die in den Gesamtzellfraktionen bei gleicher Malatdehydrogenaseaktivität vorlagen.

Die Daten bestätigen die in Kapitel 3.2.7.1 aufgestellte Annahme, dass sich die gesamte β -Glucosidaseaktivität im Symplasten befindet. Die im Medium detektierte Aktivität der Linamarase und Linustatinase ist auf ein Austreten aus den Zellen zurückzuführen.

Auch die Inkubation von Zellen mit Linamarin im Rahmen der Aufnahmeuntersuchungen (Kapitel 3.2.9) ergaben, dass Linamarin in Gegenwart der Zellen nicht gespalten wird und daher keine apoplastische Linamaraseaktivität vorkommt. Mit einer noch größeren Nachweisempfindlichkeit zeigte auch die Inkubation von Zellen mit p-Nitrophenylglycosid als Cosubstrat, dass kein p-Nitrophenol nachweisbar war und keine apoplastische Linamarase vorhanden ist. Diese Ergebnisse zeigen erstmals, dass in den Zellkulturen die Linamarase nicht apoplastisch lokalisiert ist.

Interessant ist ein Vergleich der Linamaraseaktivitäten von Leinpflanzen und Zellkulturen. So weisen die Blätter der Leinpflanze ca. 6 nkat/g FG Linamaraseaktivität auf, davon sind, wie in vielen anderen Pflanzen nachgewiesen, wahrscheinlich ca. 90 % apoplastisch und 10 % symplastisch lokalisiert. Die Linamaraseaktivität, die in den Blättern symplastisch vorliegt, besitzt somit eine Größe von ca. 0,6 nkat/g FG. Diese Aktivität symplastischer β -Glucosidase entspricht der Aktivität, die im Symplasten der Zellkulturen nachgewiesen wurde (0,5 nkat/g FG). Diese Daten deuten an, dass in den Leinpflanzen zwei verschiedene β -Glucosidasen vorkommen, von denen in den Zellkulturen nur die symplastische Fraktion aktiv ist oder expremiert wurde.

3.2.9 Untersuchungen zur Aufnahme von cyanogenen Glucosiden in die Zellsuspensionen und Wurzel-flüssigkulturen

Der Stoffwechsel cyanogener Glucoside wurde an vielen unterschiedlichen Pflanzen untersucht, allerdings gibt es nur wenige Untersuchungen zum Ab- und Umbau cyanogener Glucoside. Die meisten der Arbeiten beschrieben nur die Veränderung des Gehaltes cyanogener Glucoside von pflanzlichen Geweben oder Organen im Zuge ihrer Entwicklung (STAFFORD, 1969; CLEGG et al., 1979). Da in diesen Arbeiten die Prüfung fehlte, ob Blausäure aus den Pflanzen gasförmig freigesetzt wurde oder nicht, konnte nicht entschieden werden, ob die beschriebenen Abnahmen im Gehalt an cyanogenen Glucosiden auf eine Metabolisierung zurückgehen, oder ob die cyanogenen Glucoside über eine Cyanogenese abgebaut wurden. Eine tatsächliche Umsetzung konnte erstmalig an *Hevea brasiliensis* am Beispiel des Linamarins eindeutig nachgewiesen werden (LIEBEREI et al., 1985; SELMAR et al., 1988). Inzwischen konnte der von Selmar postulierte „Linustatin-Weg“, in dem das Diglucosid Linustatin als Transportmetabolit fungiert, für andere Linamarin haltige Pflanzen (*Manihot esculenta* und *Linum usitatissimum*) belegt werden (SELMAR, 1992). Darüberhinaus zeigten Swain & Poulton (1994), dass auch das cyanogene Monoglucosid Prunasin als Diglucosid Amygdalin im Zuge der Sämlingsentwicklung von *Prunus serotina* verlagert und metabolisiert wird.

Ungeklärt blieb jedoch die Frage, wie nach einem Transport die cyanogenen Mono- und Diglucoside in die Zelle aufgenommen werden.

In intakten Leinpflanzen erfolgt der Import der cyanogenen Diglucoside in die *sink*-Organe. Da die Zellen dieser Organe in der Regel hohe endogene Konzentrationen cyanogener Glucoside besitzen, ist eine exakte Differenzierung zwischen endogenen und importierten Glucosiden nur schwer möglich.

Die Zell- und Organkulturen des Leins enthalten dahingegen nur 0,1 % der Konzentration cyanogener Glucoside, die in Pflanzen nachgewiesen wurden. Da die Kulturen Nährstoffe aus dem Kulturmedium aufnehmen müssen, repräsentieren sie ein allgemeines, physiologisches *sink*. Auf Grund der einfachen Applikation und der Homogenität des Pflanzenmaterials eignen sich die Kulturen hervorragend für entsprechende Aufnahmestudien.

3.2.9.1 Aufnahmeversuche mit Zellsuspensionen

Zunächst mußten die Bedingungen zur Applikation cyanogener Glucoside optimiert werden. Dabei kam der Auswahl des geeigneten Entwicklungsstadiums eine besondere Bedeutung zu.

Die Daten zur Veränderung des Gehaltes cyanogener Glucoside in Abhängigkeit des Kulturalters (Abbildung 22) zeigten, dass nach 6 Kulturtagen der Gehalt an Cyanglucosiden sehr gering war und ein Anstieg in den darauffolgenden zwei Tagen nicht zu erwarten war. Während dieser Zeit befanden sich die Zellen in einer linearen Wachstumsphase, so dass sie ein ausgesprochen großes physiologisches *sink* darstellten. Zellen, die 6 Tage unter Standardbedingungen kultiviert wurden, waren daher ein sehr gut geeignetes Material zur Applikation von cyanogenen Glucosiden und der Untersuchung der Aufnahme dieser Glucoside und wurden für die Studien eingesetzt.

Appliziert wurde das cyanogene Diglucosid Linustatin. Um zu prüfen, ob die applizierten Glucoside teilweise im Medium hydrolysiert wurden, wurde im Kulturkolben ein Gefäß mit Natronlauge integriert, in dem freigewordene Blausäure angereichert wurde (siehe Kapitel 2.2.9.1). Auf diese Weise konnte eine Verletzung der Zellen im Zuge des Versuchsansatzes detektiert werden und die Menge der cyanogenen Glucoside im Versuchskolben vollständig bilanziert werden.

3.2.9.1.1 Untersuchung der Aufnahme von Linustatin in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Um Aussagen über den zeitlichen Verlauf der Aufnahme machen zu können und einen optimalen Inkubationszeitraum festzulegen, wurde das Medium einer Zellsuspension mit Linustatin versetzt und zu unterschiedlichen Zeiten Aliquote des Mediums aus dem Kolben entnommen. Das entnommene Medium wurde, wie auch die Zellen, am Ende der Inkubation über HPLC getrennt und die Mengen an Linustatin und Linamarin quantifiziert (siehe Abbildung 35).

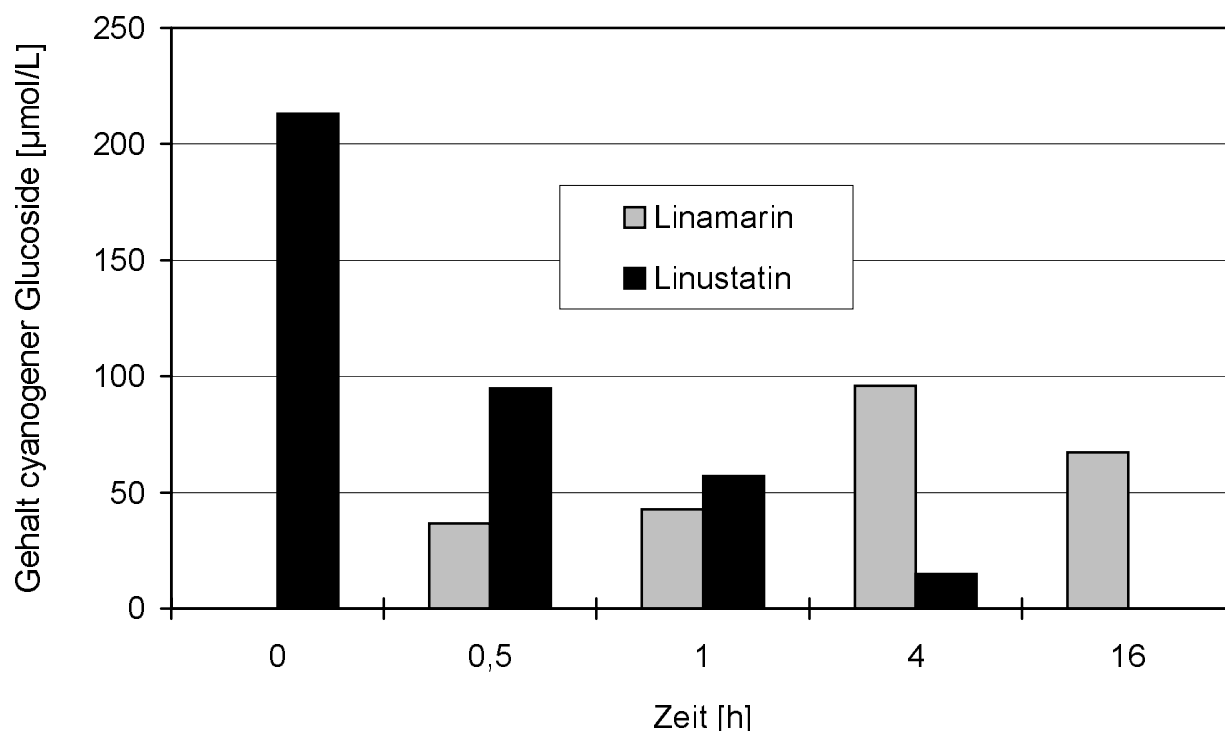


Abbildung 35: Gehalt cyanogener Glucoside im Medium von Zellsuspensionskulturen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Die Inkubation der Zellsuspensionen erfolgte unter Standardbedingungen mit zugesetzter Natronlaugevorlage (siehe Kapitel 2.2.9.1). Zu Beginn der Inkubation wurden dem Medium 200 µmol/L Linustatin zugesetzt. Das Medium wurde schockgefroren, und wie in Kapitel 2.7.8.1 beschrieben methanolisch extrahiert. Die Analyse der cyanogenen Glucoside erfolgte über ein HPLC-System mit RP-18 Säule (siehe Kapitel 2.2.9).

Tabelle 12: Konzentration cyanogener Glucoside in den Zellen der Zellsuspensionskultur nach 16 Stunden Inkubation mit appliziertem Linustatin

Die Inkubation der Zellsuspensionen erfolgte unter Standardbedingungen mit zugesetzter Natronlaugevorlage (siehe Kapitel 2.2.9.1). Zu Beginn der Inkubation wurden dem Medium 200 µmol/L Linustatin zugesetzt. Die Zellen wurden nach 16 Stunden Inkubation schockgefroren, und wie in Kapitel 2.2.7.8.1 beschrieben methanolisch extrahiert. Die Analyse der cyanogenen Glucoside erfolgte über ein HPLC-System mit RP-18 Säule (siehe Kapitel 2.2.9).

| Inkubationszeit [h] | Konzentration Linamarin [µmol/L] | Konzentration Linustatin [µmol/L] |
|------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| 16 | 880 | nicht detektierbar |

Eine Betrachtung der Linustatinkonzentration im Medium im Verlauf der Inkubation zeigte, dass die Linustatinkonzentration stark sank und Linustatin nach 16 Stunden nicht mehr nachweisbar war. Bereits nach einer kurzen

Inkubationszeit (30 min.) der Zellen mit dem exogenen Cyanglucosid waren 50 % des applizierten Linustatins nicht mehr im Medium zu detektieren.

Dahingegen wurde im Medium schon nach 30 Minuten Linamarin bestimmt, dessen Konzentration im Laufe einer vierstündigen Inkubation bis auf 80 $\mu\text{mol/L}$ anstieg. Nach weiteren 12 Stunden Inkubation blieb die Konzentration des cyanogenen Monoglucosides jedoch gleich.

In den Natronlaugenvorlagen, die als „Cyanid-Fallen“ fungierten, war keine Blausäure zu detektieren. Das bedeutet, dass keine cyanogenen Glycoside im Medium hydrolysiert wurden. Da alle Linamarin und Linustatin hydrolysierenden Enzyme symplastisch vorliegen (siehe Kapitel 3.2.8), wurde so bewiesen, dass die Zellen im Zuge des Applikationsversuches nicht verletzt wurden und keine hydrolytischen Enzyme des Symplasten ins Medium abgegeben wurden. Die Veränderungen der Konzentration sowohl des cyanogenen Diglucosides Linustatin als auch des Monoglucosides Linamarin sind mit der Verlagerung in und aus den Zellen zu erklären und werden nicht durch eine apoplastische Hydrolyse des Linustatins verursacht.

Die Zellen der Zellsuspensionskulturen enthielten nach 16 Stunden Inkubation eine Konzentration an Linamarin von 880 $\mu\text{mol/L}$, wohingegen kein Linustatin nachgewiesen wurde. Die Konzentration cyanogener Glucoside in den Zellen lag nach abgeschlossener Inkubation 3,5-fach über der zu Beginn des Versuchs ins Medium applizierten Linustatin-Konzentration. Diese Anreicherung cyanogener Glycoside in den Zellen gegenüber dem Medium zeigt, dass die Zellen cyanogene Glycoside aufnehmen und akkumulieren. Da in den Zellen aber nicht das applizierte Linustatin nachgewiesen wurde, sondern Linamarin, muß nach der Aufnahme des Linustatins in den Zellen eine Hydrolyse des Diglucosides stattgefunden haben. Im Medium kann diese Hydrolyse nicht stattgefunden haben, da die gesamte Linustatinaseaktivität symplastisch nachgewiesen wurde. Allerdings wurde im Laufe der Inkubation auch immer mehr Linamarin im Medium detektiert. Da das Linamarin nicht durch eine Hydrolyse des Linustatins im Medium gebildet werden konnte (gesamte Linustatinaseaktivität symplastisch), muß das Linamarin aus den Zellen stammen. Es wurde daher angenommen, dass eine derart hohe Konzentration an aufgenommenen Glucosiden in den Zellen, die

70-fach über der endogenen Konzentration an Linamarin lag, zu einer Abgabe des Monoglucosides ins Medium führte.

Ein Vergleich der Menge applizierten Linustatins mit der Summe cyanogener Glycoside in Zellen und Medium nach der Inkubation (Abbildung 35 und Tabelle 12) zeigte, dass die Gehalte an cyanogenen Glucosiden zu Beginn und am Ende der Inkubation nahezu übereinstimmten. Es wurde keine Umsetzung des angebotenen Linustatins durch die Zellen zu nicht cyanogenen Verbindungen beobachtet. Außerdem bestätigen diese Daten, dass keine Hydrolyse des applizierten Linustatins oder des abgegebenen Linamarin zu Blausäure stattgefunden hat. Dieses Experiment beweist, dass die gesamte Linamarase- und Linustatinaseaktivität in den Zellkulturen symplastisch lokalisiert ist und außerhalb der Zelle keine Hydrolyse stattfindet. Diese Daten bestätigen damit die Vermutungen die in Kapitel 3.2.8 zur Lokalisation der Enzyme formuliert wurden.

3.2.9.1.2 Einfluss der Konzentration auf die Aufnahme von Linustatin

Die in Kapitel 3.2.9.1.1 beschriebenen Untersuchungen zur Aufnahme von Linustatin in die Zellen der Zellsuspension zeigten, dass das applizierte Linustatin nach einem Tag aufgenommen worden war.

Um weitere Aussagen über die Aufnahme cyanogener Glucoside machen zu können, wurden die Inkubationsbedingungen weiter variiert. Dabei sollte die Wirkung der Konzentration der applizierten cyanogenen Glucoside auf die Aufnahme untersucht werden.

Die Zellen und das Medium wurden nach der Inkubation mit Linustatin und einer entsprechenden Aufarbeitung über HPLC fraktioniert und der Gehalt cyanogener Glucoside quantifiziert. Die Daten zeigen, dass die Konzentration an Linamarin in den Zellen mit steigender Konzentration des applizierten Diglucosides zunahm. Im Gegensatz zum cyanogenen Monoglucosid Linamarin wurde das korrespondierende Diglucosid in den Zellen der Zellsuspensionskulturen nicht detektiert.

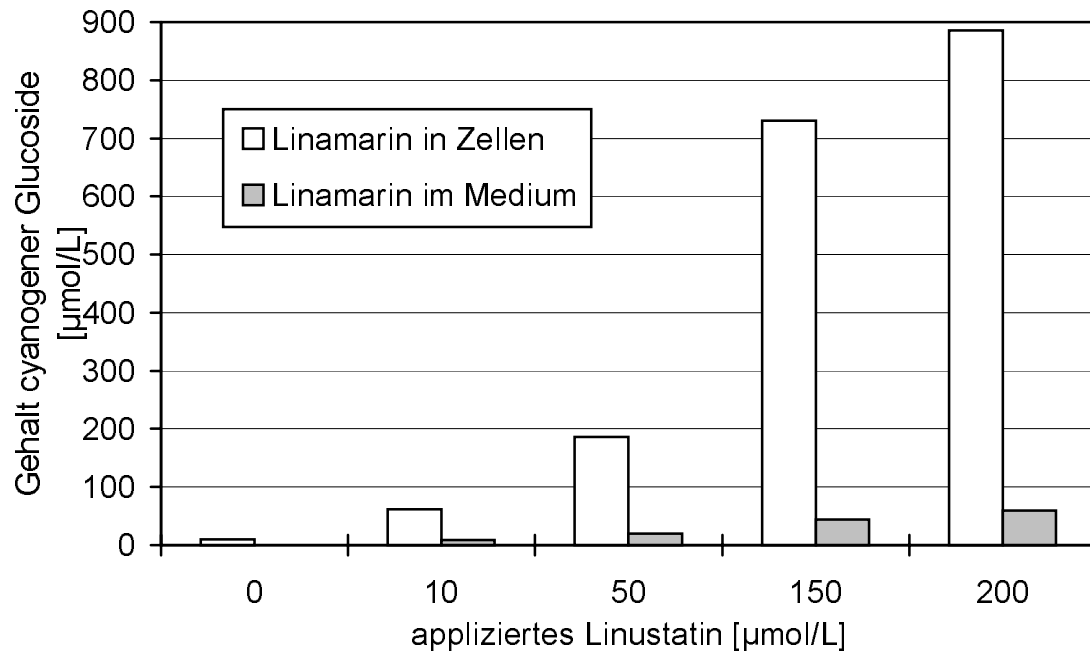


Abbildung 36: Gehalt aufgenommener cyanogener Glucoside in Zellsuspensionskulturen und deren Medium in Abhängigkeit der applizierten Linustatinkonzentration

Die Inkubation der Zellsuspensionen erfolgte unter Standardbedingungen mit zugesetzter Natronlaugevorlage (siehe Kapitel 2.2.9.1). Zu Beginn der Inkubation wurden dem Medium zwischen 0 - 200 $\mu\text{mol/L}$ Linustatin zugesetzt. Die Zellen und das Medium wurden nach 16 Stunden Inkubation schockgefroren, und wie in Kapitel 2.2.7.8.1 methanolisch extrahiert. Die Analyse der cyanogenen Glucoside erfolgte über ein HPLC-System mit RP-18 Säule (siehe Kapitel 2.2.9.3.). ***Linustatin wurde in den Zellen und dem Medium nicht nachgewiesen und ist daher nicht in der Abbildung dargestellt.*** Der für 0 $\mu\text{mol/L}$ dargestellte Wert stammt aus Abbildung 25.

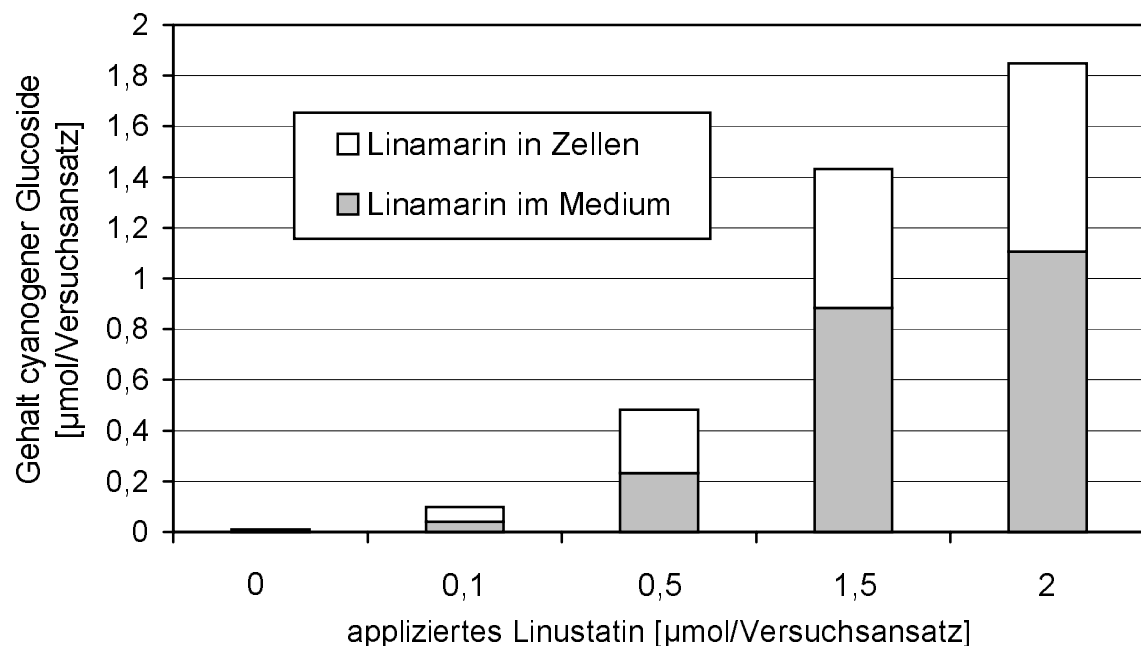


Abbildung 37: Summe cyanogener Glucoside aus Medium und Zellen in Abhängigkeit von der applizierten Linustatinkonzentration

Die Inkubation der Zellsuspensionskulturen erfolgte unter Standardbedingungen mit zugesetzter Natronlaugevorlage (siehe Kapitel 2.2.9.1). Die dargestellten Daten wurden aus den Werten der Abbildung 36 kombiniert.

Die Konzentration cyanogener Glucoside in den Zellen erhöhte sich bis auf ein vielfaches der Konzentration des zu Beginn des Versuches applizierten Linustatins und erreichte eine Konzentration von 890 $\mu\text{mol/L}$. Damit enthielten die Zellen nach der Inkubation eine 80-fach höhere Konzentration cyanogener Glucoside als ihre endogene Linamarinkonzentration. Wie die Ergebnisse des Versuchs zum zeitlichen Verlauf der Linustatin-Aufnahme, zeigten auch diese Daten, dass Linustatin in die Zellen aufgenommen wurde und dort nach Hydrolyse zu Linamarin akkumuliert wurde.

Bei den Untersuchungen der Medien wurde ebenfalls das cyanogene Monoglucosid Linamarin detektiert. Das applizierte Linustatin war zu diesem Zeitpunkt bereits vollständig aufgenommen worden und konnte im Medium nicht mehr nachgewiesen werden (siehe Kapitel 3.2.9.1.1). Da das Linamarin nicht durch eine Hydrolyse des Linustatins im Medium gebildet werden konnte (gesamte Linustatinaseaktivität symplastisch), muß das Linamarin aus den Zellen stammen. Es wurde daher angenommen, dass eine derart hohe Konzentration an aufgenommenen Glucosiden in den Zellen zu einer Abgabe des Monoglucosids ins Medium führte. Dabei scheiden die Zellen um so mehr Linamarin aus, desto mehr Linustatin sie aufgenommen haben. Die Konzentration an Cyanglucosid war in den Zellen immer 10-15 fach höher als die Linamarinkonzentration im Medium.

Dennoch war der Gehalt cyanogener Glucoside im Medium und in den Zellen gleich der Menge applizierten Linustatins, eine Umsetzung zu nicht cyanogenen Verbindungen hatte zu diesem Zeitpunkt noch nicht stattgefunden. Diese Daten bestätigten zum einen die Untersuchung der Natronlaugevorlagen, dass keine Cyanogenese stattgefunden hat und belegen zum anderen, dass keine cyanogenen Glycoside zu nicht cyanogenen Substanzen metabolisiert werden.

Zusammenfassung: Die Zellen nehmen angebotenes Linustatin auf, wandeln es um und geben es zu einem beträchtlichen Teil als Linamarin ins Medium ab, dabei kann die Aufnahme durch ein höheres Linustatin-Angebot gesteigert werden.

3.2.9.1.3 Bestimmung der Linustatinaufnahme bei unterschiedlichen pH-Werten im Medium

Um den Mechanismus der Aufnahme cyanogener Glucoside besser beschreiben zu können, wurden die Inkubationsbedingungen weiter variiert. Dabei wurde neben der Wirkung der Konzentration der applizierten cyanogenen Glucoside auch der Einfluß des pH-Wertes auf die Aufnahme untersucht.

Die Zellsuspensionen wurden mit Linustatin versetzt und der pH-Wert des Mediums im physiologischen Bereich zwischen 4,5 und 7 variiert. Medium und Zellen wurden am Ende der Inkubation nach entsprechender Aufarbeitung über HPLC-Trennung differenziert und die Mengen an Linustatin und Linamarin quantifiziert.

In der Abbildung 38 sind die ermittelten Konzentrationen cyanogener Glucoside in den Zellen und Medien der Aufnahmeexperimente dargestellt.

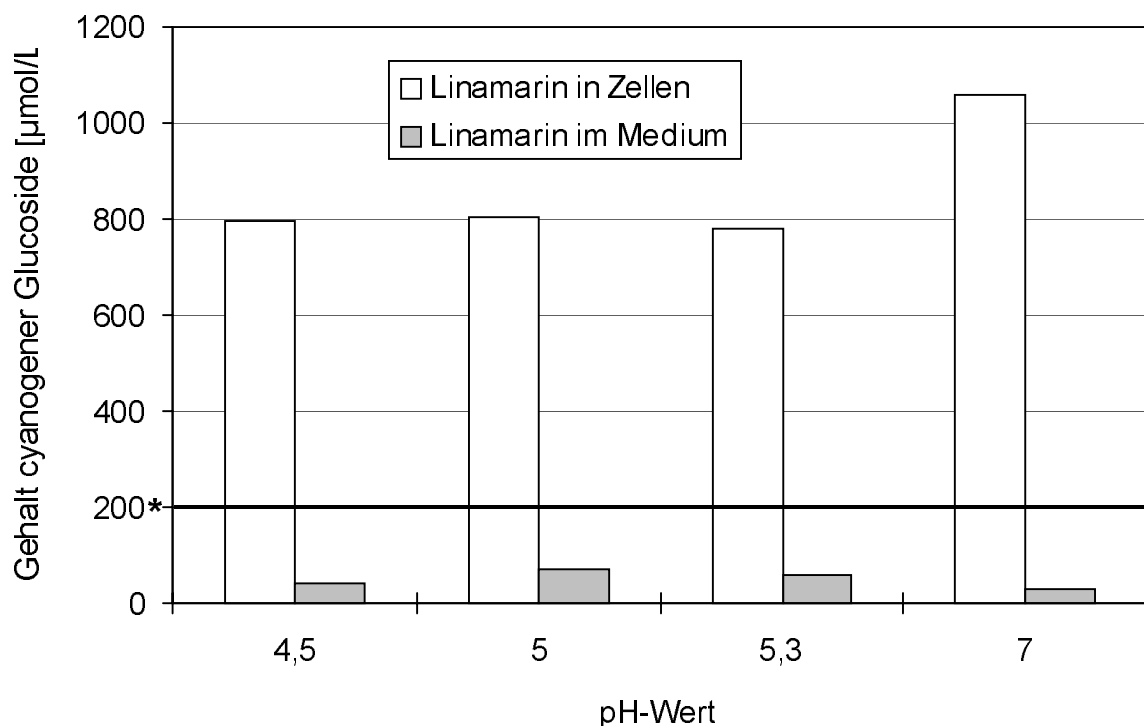


Abbildung 38: Gehalt aufgenommener cyanogener Glucoside in Zellsuspensionskulturen und deren Medium in Abhängigkeit vom pH-Wert des Mediums

Die Inkubation der Zellsuspensionen erfolgte unter Standardbedingungen mit zugesetzter Natronlaugevorlage (siehe Kapitel 2.2.9.1).

*) Zu Beginn der Inkubation wurden dem Medium 200 µmol/L Linustatin zugesetzt.

Der pH-Wert der Medien wurde nach dem Autoklavieren auf Werte zwischen 4,5 und 7 eingestellt. Die Zellen und das Medium wurden nach 16 Stunden Inkubation schockgefroren, und wie in Kapitel 2.2.7.8.1 methanolisch extrahiert. Die Analyse der cyanogenen Glucoside erfolgte über ein HPLC-System mit RP-18 Säule (siehe Kapitel 2.2.9.3). **Linustatin wurde in den Zellen und dem Medium nicht nachgewiesen und ist daher nicht in der Abbildung dargestellt.**

Die Ergebnisse zeigten, dass die Konzentration an Linamarin in den Zellen durch den pH-Wert des Mediums beeinflusst wurde. Eine Ansäuerung des Mediums führte zu keiner signifikanten Veränderung der Konzentration cyanogener Glucoside in den Zellen. Auch bei einem sehr sauren pH-Wert von 4,5 blieb die Konzentration an Linamarin in den Zellen nahezu unverändert. Im Gegensatz dazu führte ein gegenüber dem Zellmilieu höherer pH-Wert zu einer deutlich erhöhten Konzentration (ca. 20 %) an Linamarin in den Zellen. In keinem Fall war durch eine Veränderung des pH-Wertes Linustatin in den Zellen zu detektieren.

Untersuchungen des Mediums zeigten ebenfalls eine Beeinflussung der Konzentration cyanogener Glucoside durch den pH-Wert. Während eine geringe Ansäuerung des Mediums keine signifikante Veränderung der detektierten Linamarin-Konzentration verursachte, besaß das Medium mit einem pH-Wert von 4,5 nur noch die Hälfte der Konzentration, die im Medium unter Standardbedingungen nachgewiesen wurde. Da der Gehalt in diesen Zellen jedoch unbeeinflusst blieb, zeigte die Summe der cyanogenen Glucoside aus Zellen und Medium im Vergleich zu der applizierten Konzentration an Cyanglucosiden eine negative Bilanz. Die Natronlaugevorlage dieses Inkubationsansatzes besitzt eine Konzentration an Blausäure von 0,6 $\mu\text{mol/mL}$ NaOH, so dass in dem Inkubationsansatz die „fehlenden“ 0,3 μmol (15 % des applizierten Linustatins) der cyanogenen Glucoside hydrolysiert wurde. Da Blausäure in der Natronlaugevorlage nachgewiesen wurde, muß es zu einer Hydrolyse der cyanogenen Glycoside im Medium gekommen sein. Dies führt zu der Schlußfolgerung, dass hydrolytische Enzyme aus dem Symplasten der Zellen ins Medium ausgetreten waren, welche die cyanogenen Glycoside zu Blausäure abgebaut haben. Die Blausäure entwich als Gas und wurde auf Grund des Verteilungsgleichgewichts im alkalischen Milieu der Natronlauge akkumuliert. Durch den sauren pH-Wert wurde vermutlich die Integrität der Zellen zerstört und in Folge der zerstörten Kompartimentierung gelangten die hydrolytischen Enzyme ins Medium.

Wie die Konzentration der aufgenommenen cyanogenen Glycoside zeigt, blieb die Aufnahme des Linustatins unbeeinflusst, da sie, wie aus dem zeitliche Verlauf der Aufnahme zu ersehen ist (siehe Kapitel 3.2.9.1.1), sehr schnell erfolgte.

Die Aufnahme des Linustatins erfolgt nicht geringer als unter Standardbedingungen, so dass kein angebotenes Linustatin gespalten wurde. Hingegen war im Medium weniger Linamarin nachweisbar, da es von den freigesetzten hydrolytischen Enzymen abgebaut wurde.

Da während der Inkubationsdauer unabhängig vom pH-Wert des Mediums die gesamte angebotene Menge Linustatin aufgenommen wurde, wurde gefolgert, dass der pH-Wert den Aufnahmemechanismus nicht beeinflusst.

Während eine erhöhte Protonenkonzentration im Medium zu keiner Steigerung der Akkumulation führte, bewirkte eine Verringerung der Protonenkonzentration und Erhöhung der Hydroxidionen eine Steigerung der Akkumulation.

3.2.9.1.4 Einfluß weiterer Linamarasesubstrate auf die Aufnahme von Linustatin

Durch Wettbewerbsversuche mit verschiedenen cyanogenen und nicht cyanogenen Glucosiden, die sich im Aglycon bzw. im Zuckerteil unterscheiden, wurde untersucht, wie die Aufnahme von Linustatin durch andere Glucoside beeinflusst wird und ob die chemische Struktur der Glucoside wichtig ist für den Translokator des Linustatins.

Für diese Untersuchungen wurde das cyanogene Diglucosid Amygdalin mit aromatischer Aglyconstruktur ausgewählt und das dazu korrespondierende Monoglucosid Prunasin. Als weiteres eventuell kompetitiv wirkendes Glycosid wurde p-Nitrophenylglucopyranosid eingesetzt. Dieses Monoglucosid mit nicht cyanogenem Aglycon wird als künstliches Substrat von vielen β -Glucosidasen, die Cyanglucoside hydrolysieren, gespalten.

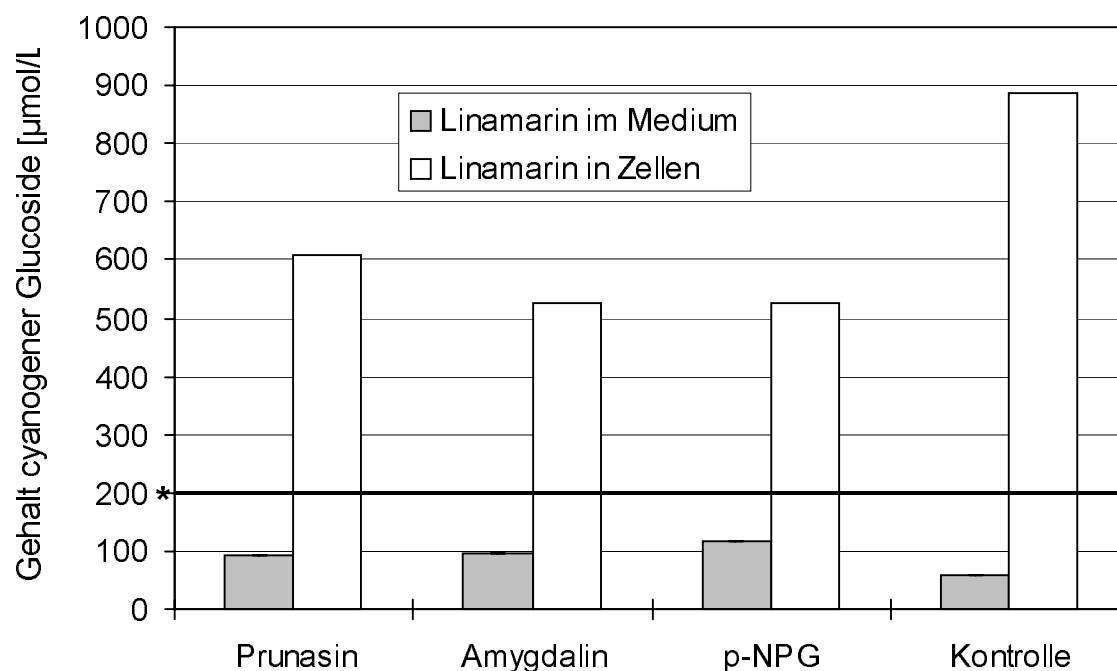


Abbildung 39: Gehalt aufgenommener cyanogener Glucoside in Zellsuspensionskulturen und deren Medium beeinflusst durch weitere Glucoside im Medium

Die Inkubation der Zellsuspensionen erfolgte unter Standardbedingungen mit zugesetzter Natronlaugevorlage (siehe Kapitel 2.2.9.1).

*) Zu Beginn der Inkubation wurden dem Medium neben 200 µmol/L Linustatin weitere Glucoside in einer Konzentration von 200 µmol/L zugefügt.

Die Zellen und das Medium wurden nach 16 Stunden Inkubation schockgefroren, und wie in Kapitel 2.2.7.8.1 methanolisch extrahiert. Die Analyse der cyanogenen Glucoside erfolgte über ein HPLC-System mit RP-18 Säule (siehe Kapitel 2.2.9.3). **Linustatin wurde in den Zellen und dem Medium nicht nachgewiesen und ist daher nicht in der Abbildung dargestellt.**

Die in Abbildung 39 dargestellten Konzentrationen cyanogener Glucoside zeigten, dass auch mögliche kompetitive Substrate die Aufnahme von Linustatin in die Zellen kaum beeinflusst. Weder die cyanogenen noch das nicht cyanogene Glucosid konnte eine Aufnahme von Linustatin beeinflussen, wie das am Ende der Inkubationszeit vollständig aufgenommenen Linustatin bewies. Im Gegensatz zur Aufnahme cyanogener Glucoside wurde die Akkumulation in den Zellen durch die weiteren Glucoside verändert. Alle drei Glucoside führten dazu, dass weniger Linamarin (bis zu 30 %) in den Zellen gespeichert wurde und mehr Linamarin in das Medium abgegeben wurde.

Da die Aufnahme des Linustatins durch andere cyanogene Glucoside unbeeinflusst blieb, wurde gefolgert, dass der Translokator des Linustatins spezifisch ist. Die Struktur der Aglycone aller drei coinkubierten Glucoside

unterscheiden sich von dem des Linustatins durch ihr aromatisches Ringsystem. Dies kann der Grund für eine fehlende Kompetition der Aufnahme sein.

Da in der Natronlauge keine Blausäure detektiert wurde, konnte auch eine Cyanogenese der Cyanglucoside ausgeschlossen werden. Auch im Fall der Coinkubation war der Gehalt an Linamarin in Zellen und Medium gleich der applizierten Linustatinmenge. Somit wurde auch in diesen Versuchen kein Linamarin oder Linustatin zu nicht cyanogenen Verbindungen umgesetzt.

Das nicht cyanogene Glucosid p-NPG kann von der Linamarase hydrolysiert werden und es entsteht als Produkt p-Nitrophenol. Das Medium der Inkubationsansätze mit p-NPG wurde auf das Vorkommen von p-Nitrophenol untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass kein p-Nitrophenol nachweisbar war und es zu keiner Hydrolyse durch die Linamarase kam. Diese Daten liefern einen weiteren Beweis für das symplastische Vorkommen der Linamarase.

Zusammenfassung des Kapitels 3.2.9.1: Da die Konzentration an Linustatin im Medium während der Inkubation abnahm, ohne dass es zu einer Cyanogenese kam, läßt sich feststellen, dass Linustatin von den Zellen der Zellsuspensionskulturen aufgenommen wurde. Diese Aufnahme kann durch eine erhöhte Linustatingabe gesteigert werden.

Dennoch wurde in den Zellen kein Linustatin detektiert, sondern das korrespondierende Monoglucosid Linamarin, so dass von einer Hydrolyse in den Zellen ausgegangen werden muss. Ein Teil dieses Linamarins wird von den Zellen ins Medium abgegeben.

Der pH-Wert des Mediums beeinflusst die Aufnahme von Linustatin nicht direkt, aber eine verringerte Protonenkonzentration führte zu einer Steigerung der Akkumulation des Monoglucosides in den Zellen.

Ein Einfluß auf die Aufnahme des Linustatins durch coinkubierte Glucoside wurde nicht festgestellt. Allerdings führten die coinkubierten Glycoside zu einer starken Beeinflussung der Akkumulation des Linamarins, so dass es zu einer bis um 30 % gesteigerten Abgabe von Linamarin aus den Zellen in das Medium kam.

3.2.9.2 Aufnahmeversuche mit Wurzelflüssigkulturen

Die Applikation von cyanogenen Glucosiden erfolgte in Anlehnung an die Versuche, die mit Zellsuspensionen durchgeführt wurden. Den Wurzeln wurde ebenfalls das cyanogene Diglucosid Linustatin zur Aufnahme angeboten.

Um zu kontrollieren, ob die applizierten Glucoside teilweise im Medium hydrolysiert wurden, wurde im Kulturkolben ein Gefäß mit Natronlauge integriert, in der sich freigewordene Blausäure anreichern konnte. (siehe Kapitel 2.2.7.8.2). Auf diese Weise konnte eine Verletzung der Zellen im Zuge des Versuchsansatzes nachgewiesen werden und die Menge der cyanogenen Glucoside im Versuchskolben vollständig bilanziert werden.

Für die Aufnahmeuntersuchungen mit Zellsuspensionen wurden Kulturen verwendet, deren letzte Passage 6 Tage zurück lag. Da der Gehalt cyanogener Glucoside in den Wurzeln jedoch am 6. Tag nach der Inokulation noch relativ hoch war und bis zum 8. Tag absank, wurden Wurzel ausgewählt, die bereits 8 Tage kultiviert wurden. Der Gehalt cyanogener Glucoside erreichte in 8 Tage alten Wurzeln seinen niedrigsten Wert und stieg in den darauffolgenden zwei Tagen kaum wieder an. Diese Wurzeln befanden sich, wie die Daten in Abbildung 23 zeigen in einer linearen Wachstumsphase, so dass sie ein ausgesprochen großes physiologisches *sink* darstellten.

3.2.9.2.1 Aufnahme von Linustatin in die Wurzelkulturen in Abhängigkeit der Inkubationsdauer

Um Aussagen über den zeitlichen Verlauf der Aufnahme machen zu können und einen für die Untersuchungen optimalen Inkubationszeitraum festzulegen, wurde das Medium einer Wurzelflüssigkultur mit Linustatin versetzt und zu unterschiedlichen Zeiten Aliquote des Mediums aus dem Kolben entnommen. Die Wurzeln wurden am Ende der Inkubation methanolisch extrahiert und die Extrakte wie auch das entnommene Medium wurde über HPLC getrennt und die Mengen an Linustatin und Linamarin quantifiziert (Abbildung 40 und Tabelle 13).

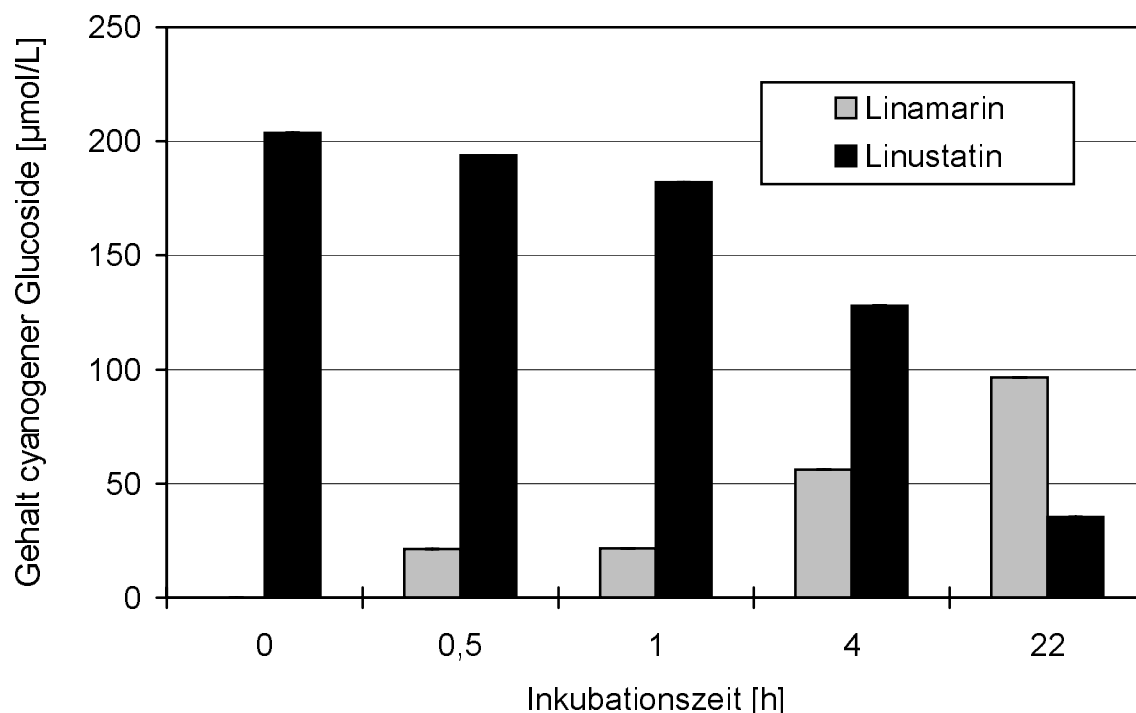


Abbildung 40: Gehalt cyanogener Glucoside im Medium von Wurzelflüssigkulturen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer

Die Inkubation der Wurzelflüssigkulturen erfolgte unter Standardbedingungen mit zugesetzter Natronlaugevorlage (siehe Kapitel 2.2.9.1). Zu Beginn der Inkubation wurden dem Medium 200 µmol/L Linustatin zugesetzt. Das Medium wurde schockgefroren und wie in Kapitel 2.2.7.8.1 beschrieben methanolisch extrahiert. Die Analyse der cyanogenen Glucoside erfolgte über ein HPLC-System mit einer RP-18 Säule (siehe Kapitel 2.2.9.3).

Tabelle 13: Konzentration cyanogener Glucoside in den Wurzeln der Flüssigkultur nach 22 Stunden Inkubation mit appliziertem Linustatin

Die Inkubation der Wurzelflüssigkulturen erfolgte unter Standardbedingungen mit zugesetzter Natronlaugevorlage (siehe Kapitel 2.2.9.1). Zu Beginn der Inkubation wurden dem Medium 200 µmol/L Linustatin zugesetzt. Die Wurzeln wurden nach 22 Stunden Inkubation schockgefroren, und wie in Kapitel 2.7.8.1 beschrieben methanolisch extrahiert. Die Analyse der cyanogenen Glucoside erfolgte über ein HPLC-System mit einer RP-18 Säule (siehe Kapitel 2.2.9).

| Inkubationszeit [h] | Konzentration Linamarin [µmol/L] | Konzentration Linustatin [µmol/L] |
|------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| 22 | 430 | nicht detektierbar |

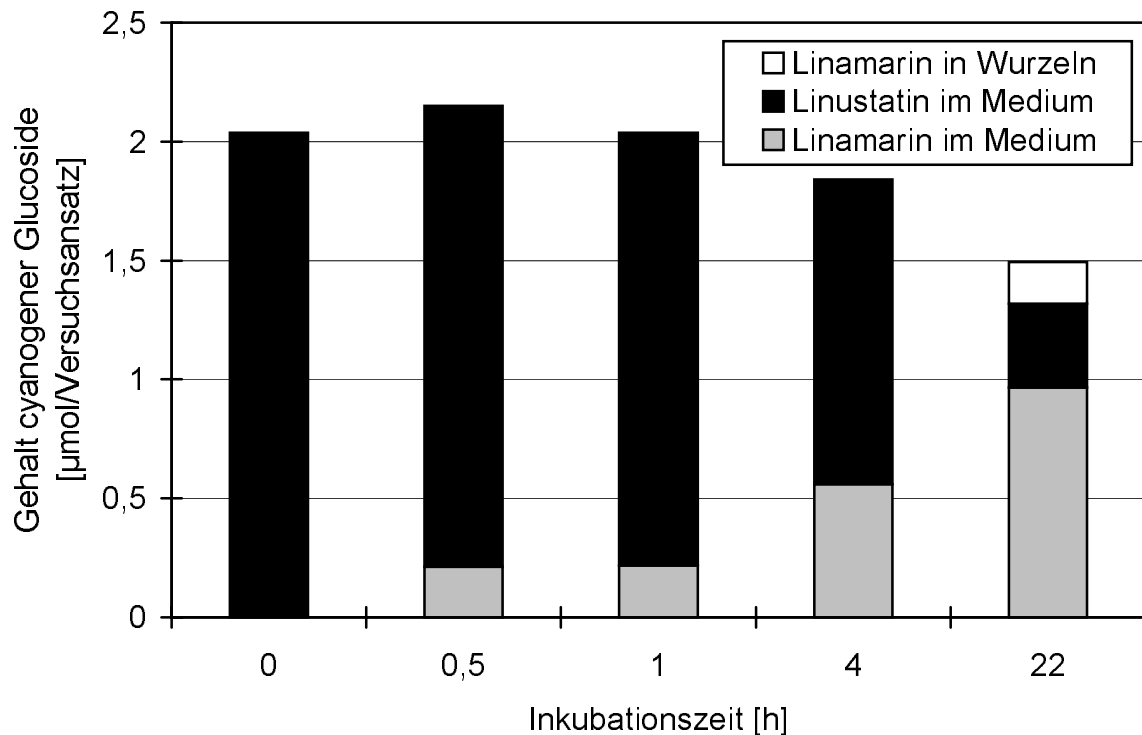


Abbildung 41: Summe cyanogener Glucoside aus Medium und Wurzeln in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer

Die Inkubation der Wurzelflüssigkulturen erfolgte unter Standardbedingungen mit zugesetzter Natronlaugevorlage (siehe Kapitel 2.2.9.1). Die dargestellten Daten wurden aus den Werten der Abbildung 40 und Tabelle 13 kombiniert.

Während der Inkubation der Wurzeln mit appliziertem Linustatin, wurde nach einer Stunde eine deutliche Abnahme der Linustatinkonzentration im Medium beobachtet, die sich bis zum Ende der Inkubation fortsetzte. Das Absinken der Linustatinkonzentration im Medium erfolgte deutlich langsamer als bei den Zellsuspensionen. Nach einer Stunde Inkubation waren noch 92 % Linustatin nachweisbar und auch nach 22 Stunden wurden noch 20 % der Anfangskonzentration detektiert. Im Gegensatz zu den Zellsuspensionskulturen wurde im Versuchszeitraum nicht die gesamte Menge des angebotenen Linustatins aufgenommen.

Nach kurzer Inkubationsdauer wurde neben Linustatin das cyanogene Monoglucosid Linamarin bestimmt, dessen Konzentration im Verlauf der Inkubation deutlich anstieg. Dabei war auffällig, dass die Linamarinkonzentration innerhalb der ersten vier Stunden zunächst stark anstieg, sich in den darauf folgenden 19 Stunden jedoch nur noch verdoppelte.

In den Natronlaugenvorlagen, die als „Cyanid-Fallen“ dienten, wurde keine Blausäure detektiert. Daraus wurde geschlossen, dass die Wurzeln im Zuge des Applikationsversuches nicht verletzt wurden und keine hydrolytischen Enzyme des Symplasten ins Medium abgegeben wurden. Da im Medium und im Apoplasten der Wurzeln keine Linamarin und Linustatin spaltenden β -Glucosidasen vorkommen, waren die Veränderungen der Konzentration sowohl des cyanogenen Diglucosides Linustatin als auch des Monoglucosides Linamarin nicht durch eine apoplastische Hydrolyse des Linustatins verursacht. Die Gehaltsänderungen wurden verursacht durch eine Aufnahme von Linustatin und spätere Abgabe von Linamarin aus den Zellen.

In den Wurzeln der Flüssigkulturen wurde nach 22 Stunden Inkubation eine im Vergleich zur endogenen Konzentration stark erhöhte Konzentration an Linamarin (430 $\mu\text{mol/L}$) bestimmt, wohingegen kein Linustatin nachweisbar war. Die Konzentration cyanogener Glucoside in den Wurzeln war damit nach der Inkubation doppelt so hoch wie die Konzentration cyanogener Glucoside im Medium zu Beginn des Versuchs. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Wurzeln das cyanogene Diglucosid aufnahmen, es zu Linamarin hydrolysierten und anschließend akkumulierten. Ein Teil des umgesetzten Linamarins wurde von den Wurzeln wieder ins Medium abgegeben. Eine so stark erhöhte Glucosidkonzentration gegenüber der endogenen Konzentration an Linamarin kann vermutlich in den Zellen osmotische Störungen auslösen, so dass ein Teil des Glucosides ausgeschleust wurde.

Ein Vergleich der Menge applizierten Linustatins mit der Summe des in die Zellen aufgenommenen Linamarins und des nach der Inkubation im Medium enthaltenen Linustatins und Linamarins zeigte, dass die Gehalte an cyanogenen Glucosiden zu Beginn und am Ende der Inkubation nicht übereinstimmten. Die Summe der in Zellen und Medium nachgewiesenen cyanogenen Glycoside betrug nur 70 % des applizierten Linustatins. Damit konnten 30 % des Linustatins nicht mehr detektiert werden. Da während der Inkubation keine Freisetzung von Blausäure beobachtet wurde, muss davon ausgegangen werden, dass die „fehlende“ Menge Cyanglucosid in den Wurzeln zu nicht cyanogenen Verbindungen metabolisiert wurde, so dass der Cyanstickstoff mit dem Cyanid-Test nicht bestimmbar war.

3.2.9.2.2 Einfluß der Konzentration auf die Aufnahme von Linustatin in Wurzelflüssigkulturen

Die Ergebnisse der Aufnahmestudien an den Wurzeln der Flüssigkulturen zeigten, dass auch die Wurzeln Linustatin aus dem Medium aufnahmen, zu Linamarin und zu nicht cyanogenen Verbindungen umsetzen und die Cyanglucoside zum Teil akkumulierten (Kapitel 3.2.9.2.1).

In Untersuchungen mit unterschiedlichen applizierten Linustatinkonzentrationen wurde der Einfluß weiterer Inkubationsparameter bestimmt, um zu prüfen, ob es zu einer Substratsättigung des Transportmechanismus kommt.

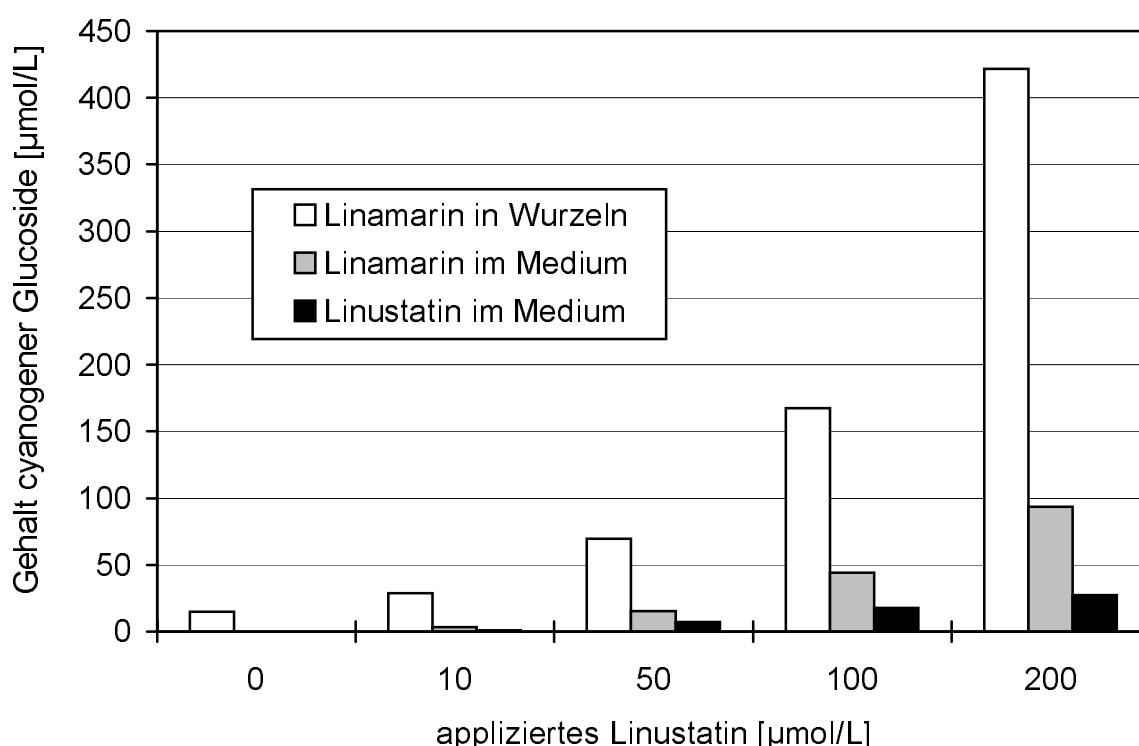


Abbildung 42: Gehalt aufgenommener cyanogener Glucoside in Wurzeln und Medium der Flüssigkulturen in Abhängigkeit von der applizierten Linustatinkonzentration

Die Inkubation der Wurzelflüssigkulturen erfolgte unter Standardbedingungen mit zugesetzter Natronlaugevorlage (siehe Kapitel 2.2.9.1). Zu Beginn der Inkubation wurden dem Medium 0 - 200 $\mu\text{mol/L}$ Linustatin zugesetzt. Die Wurzeln und das Medium wurden nach 22 Stunden Inkubation schockgefroren, und wie in Kapitel 2.2.7.8.1 beschrieben methanolisch extrahiert. Die Analyse der cyanogenen Glucoside erfolgte über ein HPLC-System mit einer RP-18 Säule (siehe Kapitel 2.2.9). **Linustatin wurde in den Wurzeln nicht detektiert und ist in der Abbildung nicht dargestellt.** Der Wert für 0 $\mu\text{mol/L}$ appliziertes Linustatin wurde gaschromatographisch bestimmt.

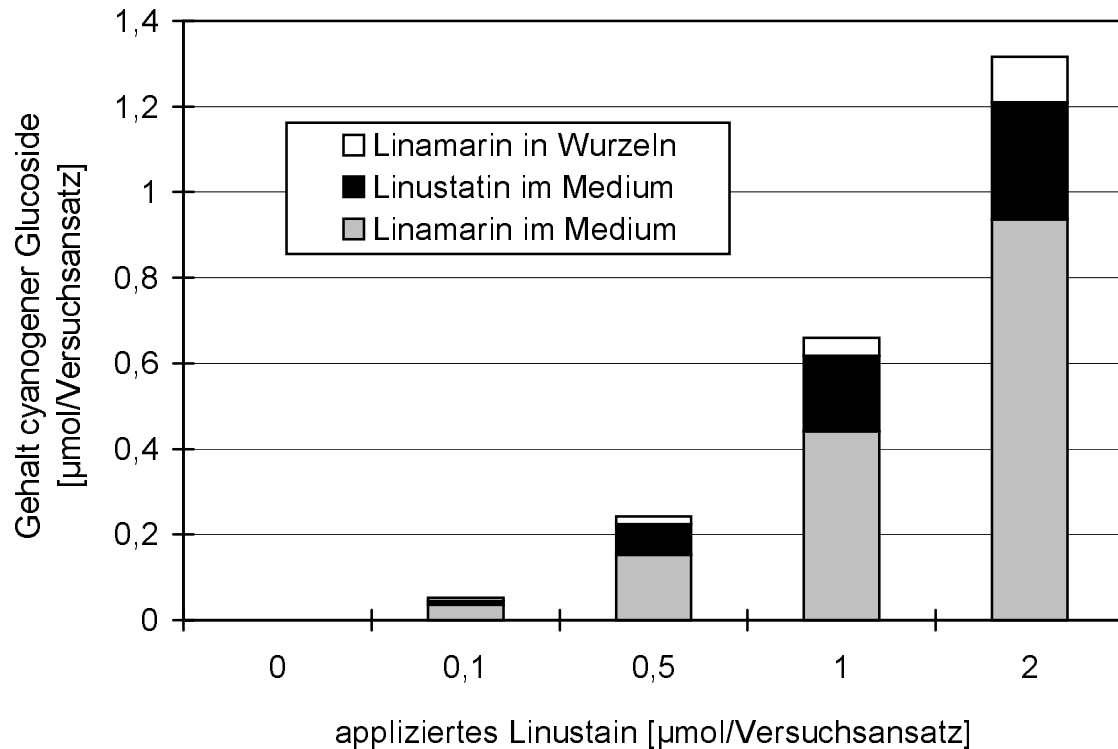


Abbildung 43: Summe cyanogener Glucoside aus Medium und Wurzeln in Abhängigkeit von der Linustatinkonzentration

Die Inkubation der Wurzelflüssigkulturen erfolgte unter Standardbedingungen mit zugesetzter Natronlaugevorlage (siehe Kapitel 2.2.9.1). Die dargestellten Daten wurden aus den Werten der Abbildung 42 kombiniert.

Die Wurzeln und das Medium, das mit unterschiedlichen Linustatinkonzentrationen versetzt wurde, wurden über HPLC fraktioniert und der Gehalt cyanogener Glucoside quantifiziert.

Die Ergebnisse zeigen, dass in den Wurzeln die Konzentration an cyanogenen Glucosiden mit zunehmender Konzentration applizierten Linustatins ansteigt. Wieder wurde nur das cyanogene Monoglucosid Linamarin nachgewiesen, nicht aber das im Medium zugesetzte Linustatin. Die Konzentration an Linamarin in den Wurzeln war doppelt so hoch wie die Anfangskonzentration cyanogener Glucoside im Medium, es mußte daraus gefolgert werden, dass die Wurzeln Linustatin aufgenommen und es als Linamarin akkumuliert haben. Die aufgenommene Menge cyanogener Glucoside überschreitet die Menge an endogenen Cyanglucosiden um ein Vielfaches, so dass auch in diesem Versuch die hohe Konzentration osmotisch wirksamer Substanzen den Stoffwechsel beeinflusste und ein Teil des aufgenommenen Linamarins in das Medium abgegeben wurde.

Die Untersuchung des Mediums zeigte, dass die Linustatinkonzentration während der Inkubation der Wurzeln abnahm. Am Ende der Inkubationsdauer waren noch 15 % der anfänglich eingesetzten Linustatinkonzentration im Medium nachweisbar. Im Gegensatz zu den Zellsuspensionen nahmen die Wurzeln nicht die gesamte Menge des angebotenen Linustatins auf. Wie auch schon der Versuch zum zeitlichen Verlauf der Linustatinaufnahme zeigte, wurde Linamarin im Medium nachgewiesen, dabei betrug die Linamarinkonzentration in allen Fällen ungefähr die Hälfte der anfangs eingesetzten Linustatinkonzentration. Die Untersuchungen aus Kapitel 3.2.9.2.1 zeigten, dass dieses im Medium detektierte Linamarin aus den Zellen stammte, die um so mehr Linamarin ausschieden, je mehr Linustatin sie aufgenommen hatten.

Wie auch im Versuch zum zeitlichen Verlauf der Aufnahme von Linustatin wurde in diesen Untersuchungen festgestellt, dass die Summe der cyanogenen Glucoside im Medium und in den Zellen nicht gleich der Menge applizierten Linustatins war. Da keine Blausäurefreisetzung beobachtet wurde, wurde auch in diesen Versuchen auf eine Metabolisierung zu nicht cyanogenen Verbindungen geschlossen.

3.2.9.2.3 Bestimmung der Linustatinaufnahme in Wurzelflüssigkulturen, beeinflusst durch unterschiedliche pH-Werte im Medium

Wie für die Zellsuspensionen wurde der Einfluß durch den pH-Wert des Mediums auf die Aufnahme von Linustatin in die Wurzeln untersucht.

Dazu wurden Wurzelsuspensionen mit Linustatin versetzt und der pH-Wert des Mediums im physiologischen Bereich zwischen 4 und 7 variiert. Die Wurzeln wurden am Ende der Inkubation methanolisch extrahiert. Die Extrakte und die Medien wurden über HPLC getrennt und die Mengen an Linustatin und Linamarin quantifiziert (siehe Abbildung 44)

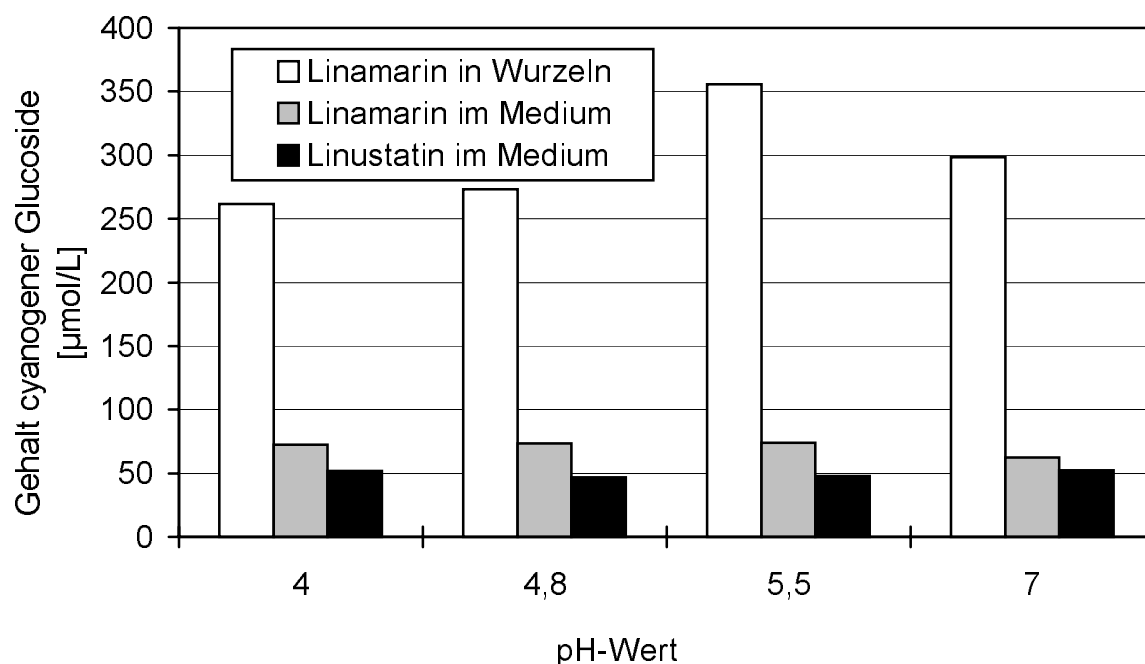


Abbildung 44: Gehalt aufgenommener cyanogener Glucoside in Wurzelflüssigkulturen und deren Medium in Abhängigkeit vom pH-Wert des Mediums

Die Inkubation der Wurzelflüssigkulturen erfolgte unter Standardbedingungen mit zugesetzter Natronlaugevorlage (siehe Kapitel 2.2.9.1). Zu Beginn der Inkubation wurden dem Medium 200 $\mu\text{mol/L}$ Linustatin zugesetzt. Der pH-Wert der Medien wurde nach dem Autoklavieren auf Werte zwischen 4 und 7 eingestellt. Die Wurzeln und das Medium wurden nach 22 Stunden Inkubation schockgefroren und methanolisch extrahiert (Kapitel 2.2.7.8.1). Die Analyse der cyanogenen Glucoside erfolgte über ein HPLC-System mit einer RP-18 Säule (siehe Kapitel 2.2.9). **Linustatin wurde in den Wurzeln nicht detektiert und ist daher nicht dargestellt.**

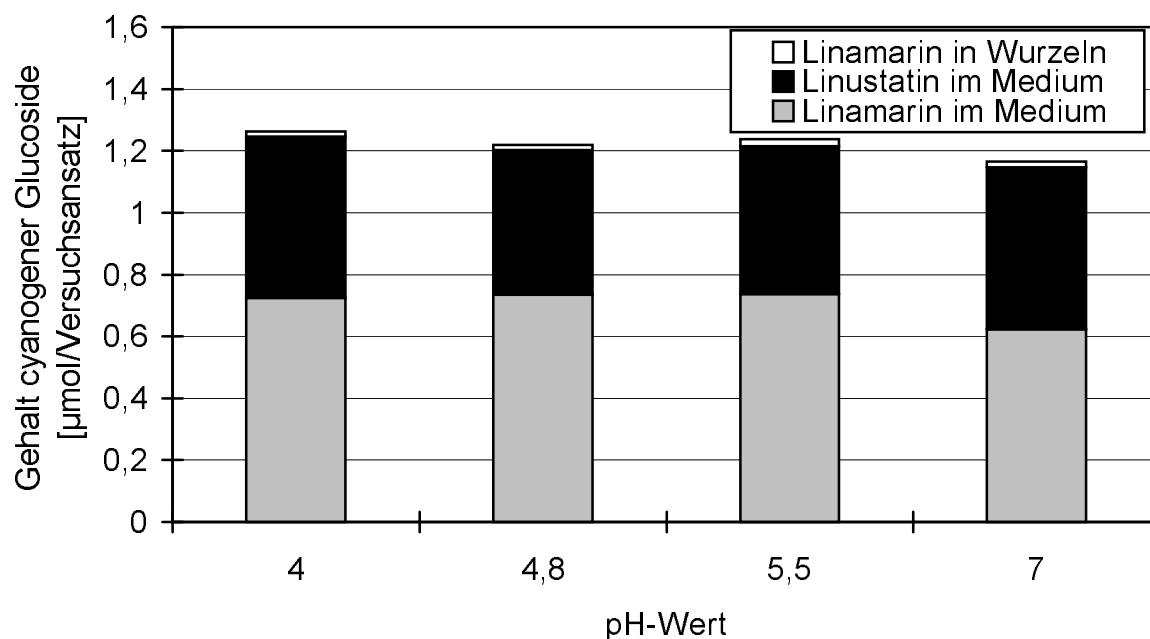


Abbildung 45: Summe der cyanogenen Glucoside in Medium und Wurzeln von Wurzelflüssigkulturen bei unterschiedlichen pH-Werten

Die Inkubation der Wurzelflüssigkulturen erfolgte unter Standardbedingungen mit zugesetzter Natronlaugevorlage (siehe Kapitel 2.2.9.1). Die dargestellten Daten wurden aus den Werten der Abbildung 44 kombiniert.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Konzentration an Linamarin in den Wurzeln durch den pH-Wert des Mediums beeinflusst wurde. Die höchste Linamarinkonzentration wurde in den Wurzeln des Standardinkubationsansatz bei pH 5,5 detektiert. In keinem Fall war durch eine Veränderung des pH-Wertes Linustatin in den Zellen nachzuweisen.

Untersuchungen des Mediums zeigten keine Beeinflussung der Konzentration cyanogener Glucoside durch den pH-Wert.

Die Konzentrationen an Linamarin und Linustatin lagen in der gleichen Größenordnung wie die Daten in den vorhergehenden Versuchsvarianten.

Die Summe der cyanogenen Glucoside aus Wurzeln und Medium im Vergleich zu der applizierten Konzentration an Cyanglucosiden war für alle pH-Werte gleich groß. Daraus wurde geschlossen, dass die Integrität der Wurzeln durch die stark von den Standardkulturbedingungen abweichenden pH-Werte nicht beeinflusst wurde und es zu keiner Freisetzung symplastischer Enzyme, wie im Fall der Zellsuspensionen, kam.

Die Ergebnisse führten zu der Schlußfolgerung, dass der pH-Wert den Aufnahmemechanismus in Wurzelflüssigkulturen nicht beeinflusst, da immer die gleiche Menge Linustatin im Medium zurück bleibt. Da allerdings bei einem pH-Wert von 5,5 die größte Menge Linamarin in den Wurzeln zurückgehalten wird, musste von einer Beeinflussung der Akkumulation des Linamarins wie im Fall der Zellsuspensionen ausgegangen werden.

Die in diesem Versuch eingesetzten Wurzeln zeigten jedoch insgesamt eine geringere Aufnahme des Linustatins als die der vorherigen Versuche. Diese geringere Aufnahmerate ist durch individuelle Unterschiede der einzelnen Chargen von Wurzelkulturen zu erklären.

Zusammenfassung: Da die Konzentration an Linustatin im Medium während der Inkubation abnahm, ohne dass es zu einer Cyanogenese kam, läßt sich feststellen, dass Linustatin von den Wurzeln der Flüssigkulturen aufgenommen wurde. Diese Aufnahme konnte durch eine erhöhte Linustatingabe gesteigert werden.

Dennoch wurde in den Wurzeln, wie in den Zellen, kein Linustatin detektiert, sondern ausschließlich das korrespondierende Monoglucosid Linamarin, so dass von einer Metabolisierung der Cyanglucoside in den Wurzeln ausgegangen werden musste. Die Bilanz cyanogener Glycoside in Zellen und Medium zeigte, dass Linamarin in den Wurzeln teilweise akkumulierte und zum Teil zu nicht cyanogenen Verbindungen umgesetzt wurde.

Der pH-Wert hatte auf den Aufnahmemechanismus keinen Einfluß und veränderte die Konzentration aufgenommenen Linustatins nicht. Dahingegen wurde die Akkumulation des Linamarins in den Wurzeln durch die Protonenkonzentration beeinflusst.

4 Diskussion

4.1 Glycosylierung und Transport - wichtige Punkte im Stoffwechsel cyanogener Glycoside

Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war der Stoffwechsel cyanogener Glycoside. Zahlreiche Untersuchungen haben sich bereits mit der Synthese, dem Transport und der Metabolisierung dieser Sekundärstoffe beschäftigt und somit ein deutliches Bild über die Prozesse gezeichnet, an denen cyanogene Glycoside beteiligt sind. Die Ergebnisse in dieser Arbeit zum Vorkommen einer Linamarin:Glucosyltransferase in Samen von *Linum usitatissimum* haben erstmals eine direkte Glucosylierung des Linamarins zu Linustatin bewiesen. Dieses Enzym wird im folgenden mit weiteren Glycosyltransferasen in anderen Pflanzen verglichen. Auf der Grundlage dieses Vergleiches wird diskutiert, welche Bedeutung dieses Enzym für den in *Hevea brasiliensis* postulierten „Linustatin-Weg“ hat. Darüberhinaus wird die Glycosylierung weiterer pflanzlicher Inhaltsstoffe erörtert.

Zweiter zentraler Punkt der beschriebenen Untersuchungen war der Transport cyanogener Glycoside und insbesondere die Aufnahme dieser Sekundärstoffe in die Zellen. Durchgeführt wurden die Experimente an dafür etablierten Zellsuspensions- und Wurzelflüssigkulturen von *Linum usitatissimum*, deren Gehalt cyanogener Glucoside bestimmt wurde. Mit den erzielten Daten wurden grundlegende Fragen zum Mechanismus der Aufnahme in die Zellen erläutert.

Um die Hintergründe der beiden Themen der vorliegenden Arbeit deutlich zu machen wird zunächst die Kompartimentierung cyanogener Glycoside und der an ihrer Synthese und Hydrolyse beteiligten Enzyme dargestellt.

4.2 Kompartimentierung und Mobilisierung cyanogener Glucoside

Das cyanogene Glucosid Linamarin wird in *Hevea brasiliensis* vollständig in der Zentralvakuole der Pflanzenzelle gespeichert (GRUHNERT et al., 1994). Auch in Blättern von *Sorghum* ist das cyanogene Monoglucosid Dhurrin in der Zentralvakuole lokalisiert (SAUNDERS & CONN, 1977). Obwohl in keiner weiteren Pflanze die Lokalisation der akkumulierten cyanogenen Monoglycoside untersucht wurde, wird angenommen, dass cyanogene Monoglycoside in der Vakuole akkumuliert werden (SELMAR, 2000). Auch für cyanogene Diglucoside

wird eine Lagerung in der Vakuole angenommen, wie im Fall des Amygdalins in Samen von verschiedenen *Prunus* Arten (POULTON, 1988). Dabei muß berücksichtigt werden, dass die Diglucoside als Transportmetabolite für kurze Zeit auch im Cytoplasma und im Apoplasten auftreten. Die Vakuole ist somit der Ort der Akkumulation (SELMAR ET AL. 1988). Hier entspricht der Stoffwechsel der cyanogenen Glycoside dem der meisten sekundären Pflanzenstoffe. So sind in nahezu allen Gruppen dieser Stoffklasse Beispiele bekannt in denen die Naturstoffe in der Vakuole akkumuliert werden (BOUDET et al., 1984), wie zum Beispiel die Alkaloide (DEUS-NEUMANN & ZENK, 1984; DEUS-NEUMANN & ZENK, 1986) oder die Anthocyane und Betalaine (LEIGH, 1983).

Während Linamarin in der Vakuole akkumuliert wird, erfolgt die Biosynthese des cyanogenen Monoglucosides im cytoplasmatischen Bereich der Zelle (CONN, 1981). *In vitro* wurde die Synthese der Hydroxynitrile mit einer Membranfraktion, die eine hohe Aktivität an Zimtsäure-4-Hydroxylase aufwies, einem Markerenzym des Endoplasmatischen Retikulums, erreicht (SAUNDERS et al., 1977a). Somit wird als Synthesort der Hydroxynitrile, der Aglyca von der cyanogenen Glucoside, das Endoplasmatische Retikulum beschrieben (SAUNDERS et al., 1977a; CUTLER et al., 1985; HALKIER et al., 1989; HALKIER et al., 1991). Für die Synthese des *p*-Hydroxymandelonitrils aus Tyrosin konnte gezeigt werden, dass zwei Cytochrome P_{450} , als membrangebundene multifunktionale Enzyme, diese Reaktionen katalysieren. Das erste P_{450} , bezeichnet als $P_{450,tyr}$, katalysiert die Umwandlung von Tyrosin zu *Z-p*-Hydroxyphenylacetaldoxim (SIBBENSEN et al., 1994 und 1995), während das zweite P_{450} , das $P_{450,ox}$ genannt wird, die Aktivierungsenergie für die Umwandlung von *Z-p*-Hydroxyphenylacetaldoxim zu *p*-Hydroxymandelonitril herabsetzt (KAHN et al., 1997).

Die Glucosylierung der Hydroxynitrile erfolgt *in vitro* durch eine lösliche UDP-Glucosyltransferase (HALBROCK et al., 1970; REAY & CONN, 1974). Ungeklärt blieb allerdings, wie die Hydroxynitrilsynthese und die Glucosylierung der Cyanhydrine in der Pflanzenzelle verknüpft sind. So könnte die Glucosyltransferase entweder an das ER assoziiert sein oder frei im Cytoplasma vorliegen. Gegen das freie Auftreten im Cytoplasma spricht, dass im Cytoplasma der Zelle auch die α -Hydroxynitril-Lyase vorhanden ist, die das synthetisierte Cyanhydrin spalten

würde. Zudem ist das Cyanhydrin bei physiologischen pH-Werten instabil und dissoziiert zu Keton und HCN (MEDERACKE, 1995). Auch eine Glycosylierung der Hydroxynitrile im Bereich der Vakuole wäre denkbar. So wurde von Sekundärstoffen, die als Glucosid in der Vakuole akkumuliert werden, angenommen, dass die Glucosylierung dieser Verbindungen mit dem Transport in die Vakuole verknüpft ist (MATREY et al., 1980). Dieser Vermutung widersprechen jedoch Untersuchungen zur Lokalisation der Glucosyltransferasen aus *Hippeastrum tulpia* (HRAZDINA et al., 1978), die an der Glucosylierung von Anthocyanin beteiligt ist, und aus *Metiotus alba* (OBA et al., 1981), welche die Bildung des *o*-Cumarsäureglucosides katalysiert. Diese Glycosyltransferasen sind wie das Dhurrin bildende Enzym aus *Sorghum* (WURTELE et al., 1982) als extravakuolär beschrieben. Es konnte noch keine Modellvorstellung bestätigt werden, wie die Glucoside in die Vakuole eintreten und ob dieser Eintritt mit einer Glucosylierung verknüpft ist.

Neben der Aufnahme vieler Sekundärstoffe in die Vakuole kann auch der Mechanismus des Austritts aus dem zentralen Kompartiment der Pflanzenzelle nicht eindeutig interpretiert werden (BOLLER und WIEMKEN, 1986). Zwar wurde gezeigt, dass in der Vakuole Proteasen (HECK et al., 1981; CANUT et al., 1985) sowie Fructanhydrolasen (KELLER et al., 1986) vorkommen, welche die immobilen Speicherformen wie Proteine und Inuline in transportfähige Monomere zerlegen können. Dennoch konnte nicht gezeigt werden, wie Aminosäuren oder Monosaccharide die Vakuole verlassen.

Zahlreiche Untersuchungen am Kautschukbaum, *Hevea brasiliensis*, haben zur Formulierung des „Linustatin-Wegs“ geführt, der den Stoffwechsel und Transport von cyanogenen Glucosiden beschreibt (SELMAR, 1988, 1993a). Grundlage für die Postulierung dieses Stoffwechselweges waren Untersuchungen zur Lokalisation der cyanogenen Glucoside und der hydrolytischen Enzyme, die eine Spaltung der Substanzen katalysieren. Die ersten Untersuchungen zur Kompartimentierung von Substrat und Enzym der verletzungsbedingten Cyanogenese wurden an *Sorghum bicolor* durchgeführt (SAUNDERS et al., 1977; THAYER & CONN, 1981). Saunders et al. isolierten Protoplasten und Vakuolen aus photosynthetisch aktiven Blättern von Hirsesämlingen und lokalisierten das gesamte Blau-

säurepotential in der Vakuole (1978). Die Kompartimentierung des Dhurrin katabolisierenden Enzyms in *Sorghum bicolor* wurde von Thayer und Conn auf subzellulärer Ebene herausgearbeitet. Sie lokalisierten die Dhurrinase in den Chloroplasten und beschrieben die α -Hydroxynitrillyase als cytosolisches Enzym. Im scharfen Kontrast dazu steht die Lokalisierung der β -Glucosidase in *Linum usitatissimum* sowie vielen weiteren cyanogenen Pflanzen (Übersicht bei Selmar, 1992; CONN, 1984; KAKES, 1990; POULTON, 1990). So wurde die Linamarase in *Linum usitatissimum* und *Lotus corniculatus* durch Infiltrationsversuche im Zellwandbereich nachgewiesen (KURZHALS, 1992). Weitere Beispiele für das Auftreten einer apoplastischen Linamarase wurden von Kakes (1985) durch Immunofluoreszenz in *Trifolium repens* aufgezeigt sowie von Frehner und Conn (1987) in *Phaseolus lunatus* und von Kurzhals (1993) in *Hevea brasiliensis*.

Während in all diesen Pflanzen im Apoplasten eine Linamarase vorkommt, wurde im Zellwandbereich der Blattgewebe dieser cyanogenen Pflanzen keine aktive Diglucosidase nachgewiesen, die Linustatin spaltet. In dem von Selmar beschriebenen Modell fungiert das Linustatin daher als Transportmetabolit des Linamarins.

Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit an Zellkulturen von *Linum usitatissimum* zeigten zunächst ein ganz anderes Bild. Während ein Teil der nachgewiesenen Aktivität der Linamarase wie bei den Pflanzenorganen unter Hochsalzbedingungen extrahiert wurde, konnte die restliche Enzymaktivität erst nach der Extraktion der Zellwandrückstände mit hypotonischen Puffersystemen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass sowohl in Pflanzen als auch in den Zell- und Wurzelkulturen verschiedene Fraktionen von β -Glucosidasen existieren, die unterschiedlich extrahierbar sind und gegenüber der Zellwand unterschiedliche Assoziationseigenschaften aufweisen. Die Verteilung der Aktivitäten in Leinpflanzen und Kulturen auf diese beiden unterschiedlichen Puffersysteme unterscheidet sich grundsätzlich voneinander. Während aus den Leinorganen mindestens 80 % der β -Glucosidaseaktivität unter Niedersalzbedingungen extrahierbar sind, werden 75 % der β -Glucosidaseaktivität in den Zell- und Wurzelkulturen unter Hochsalzbedingungen extrahiert. Wie die Untersuchungen in dieser Arbeit zeigten, ist die gesamte β -Glucosidase in den Zell- und Wurzelkulturen anders als in der Leinpflanze symplastisch

lokalisiert. Die Aktivitäten lassen vermuten, dass in den Zell- und Wurzelkulturen nur die symplastische β -Glucosidase vorkommt, wohingegen die apoplastische β -Glucosidase der Leinpflanzen in den Kulturen nicht aktiv ist. Im Gegensatz dazu wurde in Zellsuspensionskulturen von Maniok eine Sezernierung dieser Proteine in das Kulturmedium, und damit eine apoplastische Lokalisierung über die Aktivitätsbestimmung der β -Glucosidase im Medium gezeigt (HEIDBREDE, 1999). Auch Istock (1987) fand für Zellsuspensionskulturen der cyanogenen Mondbohne *Phaseolus lunatus* eine Sezernierung der β -Glucosidase in das Kulturmedium, deren Intensität abhängig von der Wachstumsphase der Zellkulturen war. Sie verzeichnete die höchste Aktivität während der stationären Phase.

4.3 Glycosyltransferase in *Linum usitatissimum*

Im Pflanzenreich sind glycosidische Verbindungen weit verbreitet, wie die überall vorkommende Synthese von Lignin, Glycoproteinen und Steroidglycosiden zeigten. Auch viele Sekundärstoffe, wie Flavonoide, Cumarine und Phenole werden in der Pflanze in glycolysierter Form gespeichert.

Die Glycosylierung dieser Substanzen erfolgt meist nach dem gleichen Reaktionsprinzip. Entsprechend der Oligosaccharid- und Stärkesynthese (HÖSEL, 1981), überträgt eine Glycosyltransferase aktivierte Zucker in Form von Nukleotid-Diphosphaten auf ein entsprechendes Akzeptormolekül. Dabei weist das Vorkommen verschiedener Glycoside in einer Pflanze darauf hin, dass die Glycosylierungsreaktionen verschiedener Aglyca gleichzeitig erfolgen. Eine kontrollierte Biosynthese der einzelnen Substanzen ist daher nur möglich, wenn die Glycosylierungsreaktionen räumlich kompartmentiert voneinander stattfinden oder die katalysierenden Enzyme eine ausreichende Substratspezifität haben.

Die an der Biosynthese von Glycolipiden (PAULSON & COLLEY, 1989) und Steroiden (KALINOWSKA & WOJCIECHOWSKI, 1987; PACZKOWSKI & WOJCIECHOWSKI, 1988; WARNECKE, 1991) beteiligten Glycosyltransferasen sind membran-gebunden. Ebenso die Glycosyltransferasen, welche die Bildung der Glucane in der Zellwandsynthese katalysieren (INGOLD & SEITZ, 1986). Für diese Glycosyltransferasen ist eine enge Substratspezifität nicht notwendig, da die

Biosynthesen an oder in einer Membran kompartimentiert erfolgen und die Stoffwechselwege somit voneinander getrennt ablaufen.

Die Glycosylierung löslicher Substanzen durch nicht-membrangebundene Enzyme muß dagegen substratspezifität erfolgen.

4.3.1 Glucosylierung von Linamarin in cyanogenen Pflanzen

Das cyanogene Diglucosid Linustatin steht als Transportmetabolit an einem wichtigen Verzweigungspunkt im Stoffwechsel von *Hevea brasiliensis* zwischen Verlagerung und anschließender Akkumulation oder Transport und vollständiger Metabolisierung. In dem Modell vom „Linustatin-Weg“ ist die Glucosylierung des Linamarins zum korrespondierenden Diglucosid ein zentraler Schritt bei der Metabolisierung der cyanogenen Glucoside (SELMAR, 1992; HILLMAR, 1999).

In zahlreichen Arbeiten wurde bereits versucht diesen wichtigen Glucosylierungsschritt nachzuweisen, doch wurden nur Hinweise und indirekte Belege für eine Linamarin:Glycosyltransferase gefunden. Ein eindeutiger Beweis dieses Enzyms, blieb jedoch aus. Einige dieser Arbeiten und ihre Versuchsansätze werden im Folgenden dargestellt.

Während Halbrock und Conn (1971) mit Fütterungsexperimenten *in vivo* eine Cyanglucosyltransferase in *Linum* nachweisen konnten, die Linamarin und Lotaustralin synthetisiert, fehlte bislang für eine Linustatin bildende Glycosyltransferase der eindeutige Beweis. Selmar (1992) untersuchte die Biosynthese cyanogener Glycoside mittels Fütterungsexperimenten mit ^{14}C -Saccharose an Leinpflanzen. Die Früchte der inkubierten Leinpflanzen enthielten zum Inkubationszeitpunkt überwiegend die cyanogenen Monoglucoside. Falls eine Glycosylierung von Linamarin stattfindet, sollte durch die Vormarkierung der Metabolite des endogenen Kohlenhydratstoffwechsels gewährleistet sein, dass bei der Bildung von Linustatin ^{14}C -markierte Verbindungen verwendet werden. Wird das Linustatin *de novo* synthetisiert, müssten beide Glucosemoleküle ^{14}C -markiert sein. Im Falle einer Glycosylierung des vorhandenen Linamarins sollte die ^{14}C -Markierung ausschließlich in der terminalen Glucose des Linustatins auftreten. Selmar konnte zeigen, dass die radioaktiv markierte Saccharose sehr gut in die Pflanze aufgenommen wurde. Bei diesem Versuch wurde kein ^{14}C -Linustatin gebildet. Selmar schloss daraus, dass

die Glycosylierung von Linamarin zu Linustatin ohne signifikante Kohlenhydratversorgung aus der Mutterpflanze erfolgt. Eine Fütterung von ^{14}C -Saccharose konnte nicht zu einem wesentlich früheren Zeitpunkt erfolgen, da in dieser Entwicklungsphase der Samen der Linamarin-Gehalt ebenfalls noch deutlich ansteigt. Eine Markierung des akkumulierten Linamarins könnte nicht ausgeschlossen werden.

Ein indirekter Beleg für die Glucosylierung von Linamarin gelang Selmar (1992) durch Applikationsversuche mit ^{14}C -Valin an Leinpflanzen: Das applizierte Valin führte zu einer Synthese von ^{14}C -Linamarin, das in den Blättern der Pflanze akkumuliert und einige Wochen später bei der Fruchtbildung in die Samen verlagert wurde. Im Zuge der Samenreifung wird das Endosperm reduziert und die Kotyledonen entwickeln sich als sekundäres Speicherorgan. Zu diesem Entwicklungszeitpunkt wurden nur noch Spuren an Linamarin nachgewiesen, die Hauptfraktion der cyanogenen Glycoside wurde durch ^{14}C -Linustatin repräsentiert. Da sowohl die Menge als auch die spezifische Radioaktivität des Linustatins in den reifen Samen mit der des Linamarins in den unreifen Samen übereinstimmten, wurde auf eine Glucosylierung des Linamarins im Endosperm und anschließenden Verlagerung als Linustatin in die Kotyledonen geschlossen.

Bei Untersuchungen der Aktivität einer Linamarin:Glucose-Glycosyltransferase in den Samen von *Linum usitatissimum* ist zu berücksichtigen, dass in Lein sehr aktive hydrolytische Enzyme (β -Glucosidasen) vorkommen, die sowohl Linamarin als auch das Diglucosid Linustatin spalten (FAN & CONN, 1985). In einem Enzymextrakt führen diese Enzyme somit zu einer drastischen Minderung der Substrat- als auch der Produktkonzentration der Glycosyltransferase. Die in dieser Arbeit eingesetzten Extraktions- und Inkubationsbedingungen wurden so gewählt, dass die Aktivität der β -Glucosidasen unterdrückt wurde. Dennoch ließ sich weder in Enzymextrakten noch in Membranfraktionen aus *Linum usitatissimum* die Aktivität einer Glycosyltransferase, die Linamarin glycolysiert, nachweisen.

Untersuchungen an *Hevea brasiliensis* zur Glucosylierung von Linamarin zeigten, dass es bei einer Inkubation von intakten Vakuolen mit ^{14}C -UDP-Glucose zu einer

radioaktiven Markierung des Linustatin kam. Kurzhals (1993) postulierte auf Grund dieser Inkubation, dass in *Hevea brasiliensis* eine Glucosyltransferase vorkommt, die am Tonoplasten lokalisiert ist. Sie hat untersucht, ob sich das Monoglucosid Linamarin durch Glucosylierung aus der Vakuole heraus-transportieren und sich damit eine Mobilisierung dieses Sekundärstoffes auf zellulärer Ebene erreichen ließ. Die Inkubation von Linamarin akkumulierenden, isolierten Vakuolen mit UDP-[U-¹⁴C] Glucose sprechen dafür, dass am Tonoplasten eine Glucosyltransferase vorkommt, die Linamarin zu Linustatin glucosyliert, das dann die Vakuole verlassen kann. Die Glucosylierung würde somit dem Modell der Transmembranglucosylierung entsprechen, die Frey-Wissling (1942) das erste Mal formulierte. Weitere Untersuchungen an Vakuolen des Zuckerrohrs von Preisser und Komor (1988) sowie Maretzki und Thom (1988) konnten diese Vorstellung jedoch nicht bestätigen.

Die Linamarin:Glucosyltransferase aus *Linum usitatissimum*, die in der vorliegenden Arbeit beschrieben wurde, zeigt ebenfalls Eigenschaften, die darauf schließen lassen, dass es sich um ein membrangebundenes Enzym handelt. So waren unterschiedlichste Extraktionsverfahren zum Nachweis dieses Enzyms nicht erfolgreich, die für viele lösliche Glucosyltransferasen wirksam angewendet wurden. Die Aktivität des Enzyms konnte erst im intakten Samen des Leins nachgewiesen werden. Die Unversehrtheit des Membransystems in den Zellen und die Milieu-Unterschiede zwischen den Kompartimenten sind wichtige Voraussetzungen für den Nachweis dieser Glucosyltransferase. Um die Frage der Lokalisierung abschließend klären zu können, ist es notwendig weitere Untersuchungen durchzuführen, in denen einzelne Kompartimente der Zelle, wie Vakuole oder Golgi-Vesikel, isoliert werden, um sie auf die Aktivität der Glucosyltransferase hin zu untersuchen.

Eine weitere membrangebundene Glucosyltransferase, die zur Bildung eines Gentiobiosids führt, konnte bisher nicht nachgewiesen werden (BECK & HOPF, 1982; WATKINS, 1986). Lediglich aus Weizenkeimlingen konnte eine lösliche Glucosyltransferase isoliert werden, die eine Reihe von phenolischen Monoglucosiden, darunter auch α -Mandelonitril, zu Gentiobiosiden glucosyliert (YAMAHA und CARDINI, 1960).

Der in der vorliegenden Arbeit beschriebene erfolgreiche Nachweis der Aktivität einer Linamarin:Glucose-Glycosyltransferase gelang hier durch die *in situ* Inkubation, bei der als Substrat eine radioaktiv markierte Glucosevorstufe angeboten wurde. Dabei war Saccharose, wie die Ergebnisse von Selmar (1992) zeigten, als Vorstufe nicht sinnvoll, da das Endosperm zu dieser Zeit ein „sink“-Gewebe darstellt, welches von außen keine Saccharose aufnimmt. Als geeignete Glucosevorstufen wurden ^{14}C -markierte Triosephosphate angeboten, die über ständig aktive Triosephosphattranslokatoren aufgenommen werden.

Diese aktivierten Zucker wurden *in situ* aus injizierter ^{14}C -Fruktose-1,6-bisphosphat hergestellt. Linamarin, das zweite Substrat der Reaktion, lag zum Inkubationszeitpunkt im Endosperm in ausreichender Menge vor (SAGASSER, 1996).

Wie die Ergebnisse zeigen, trug das aus den Samen extrahierte Linustatin eine deutliche radioaktive Markierung. Diese Daten konnten aber noch nicht die Frage klären, ob nur die terminale Glucose des Linustatins markiert wurde und diese Markierung während der Glucosylierung des Linamarins erfolgte, oder ob auf Grund einer *de novo* Synthese des Linustatins beide Glucosen markiert vorlagen. Inkubationen des ^{14}C -markierten Linustatins mit einer sequentiellen Diglucosidase, die spezifisch nur die terminale Glucose hydrolysiert, zeigten eindeutig, dass nur die hydrolytisch abgetrennte Glucose eine radioaktive Markierung trug. Das extrahierte Linamarin, das aus dem Linustatin hervorging, war in der Aglycon proximalen Glucose nicht radioaktiv markiert. Die Markierung des Linustatins wurde damit ausschließlich von einer Glucosylierung des Linamarins durch eine Linamarin:Glucose-Glycosyltransferase hervorgerufen.

4.3.2 Glycosylierung weiterer pflanzlicher Inhaltsstoffe

Neben der dargestellten Glycosylierung von cyanogenen Glycosiden treten in der Pflanze viele weitere Glycosylierungsreaktionen auf, so dass zahlreiche in der Vakuole akkumulierte Inhaltsstoffe, als glycosidische Formen vorliegen (MATILE 1978, CONN 1984). Dabei werden nicht nur sekundäre Pflanzenstoffe wie Anthocyane, Steroide, Phenole und Cyanhydrine an glycosidische Seitenketten gebunden, sondern auch Produkte des Energie- und Baustoffwechsels. So sind viele Proteine oder auch Lipide mit unterschiedlichen Zuckern glycosyliert. Dieses große Vorkommen von Glycosiden im Pflanzenreich hat dazu geführt, dass sich

viele Studien mit der biochemischen und molekularbiologischen Untersuchung von Glucosylierungsreaktionen beschäftigt haben, die hier vergleichend zur Glycosylierung cyanogener Glycoside beschrieben werden. Neben diesen Arbeiten zur Glucosylierungsreaktion, wurde in der Literatur auch immer wieder die physiologische Funktion der Glycoside für die Pflanze diskutiert.

So spielen die Glycoside eine wichtige Rolle bei der Entgiftung schädlicher Substanzen im Cytoplasma. An isolierten Protoplasten aus Gerstenblättern wurde gezeigt, das Esculin von den Zellen aufgenommen und nach erfolgter Glycosylierung zu Esculetin in die Vakuole transportiert wird (WERNER & MATILE, 1985). Das hydrophilere Esculetin kann im Gegensatz zum Aglycon nicht durch die Membran diffundieren. Auch für zahlreiche Phenole wird eine Entgiftung durch Glycosylierung diskutiert. In Zellkulturen von *Pinus densiflora* wird das keimungshemmende Phenol Hydroxybenzoesäure zu dem weniger reaktiven Glycosid metabolisiert (KATSUMATA et al., 1989).

Während es sich bei der Entgiftung um eine relativ unspezifische Glycosylierungsreaktion handelt, werden für biologisch aktive Metabolite ganz gezielte Glykositierungen zur Regulation der biologischen Aktivität diskutiert. In *Phaseolus*-Arten werden Cytokinine als inaktive Glykoside gespeichert, die bei Bedarf während bestimmter Entwicklungsphasen in die aktive Form transformiert werden (DIXON et al, 1989). Im Stoffwechsel von Jasmonsäure und Abscisinsäure treten Veresterungen mit Glucose auf, durch die biologisch aktive Derivate in weniger aktive überführt werden (SCHWARZKOPF & MIERSCH, 1992). Auch wird die Abwehrfunktion von cyanogenen Glycosiden so beschrieben, dass die stabilen biologisch inaktiven Glycoside in der Vakuole akkumuliert werden. Erst nach einer Zerstörung der Kompartimente als Folge einer Gewebeverletzung werden die Cyanglycoside hydrolytisch gespalten und die gebildeten Aglycone setzen die toxische Blausäure frei (NAHRSTEDT, 1985).

Durch die Glucosylierung ist es für die Pflanze möglich die instabilen Hydroxynitrile als cyanogene Glucoside zu akkumulieren. Der Prozess der Cyanogenese wird auf diese Weise für die Pflanze regulierbar. Auch die Akkumulation von Anthocyanen wird erst durch eine Glycosylierung möglich, da

erst die Glycoside die notwendige Stabilität besitzen. Mutanten von *Silene dioica*, denen das Enzym für die Glycosylierung von Anthocyanidinen fehlt, sind nicht in der Lage Anthocyanidine oder andere Vorstufen in der Vakuole zu speichern, da diese zuvor abgebaut werden (KAMSTEEG et al., 1987).

Die Glycoside lipophiler Substanzen sind wesentlich hydrophiler als ihre Aglyca und können daher die Vakuole durch die Membran nicht frei passieren. Die Speicherung von hydrophoben Steroidderivaten, wie Sapoine und herzwirksame Glycoside (KREIS & REINHARD, 1987) wird nur durch die Glycosylierung möglich.

Um die Lebensfunktionen aufrecht zu erhalten, ist es sowohl für die Pflanze als auch für die einzelne Zelle wichtig, Metabolite und Enzyme zu kompartmentieren. Durch diese räumliche Trennung von Synthese-, Speicher- und Wirkort ist ein gezielter Transport der unterschiedlichen Zellinhaltsstoffe unabdingbar. Auch in diesem Bereich des Molekültransportes ist eine Glycosylierung von großer Bedeutung. Bei der Proteinbiosynthese erfolgt bei der Translation am rauhen ER im Lumen eine Veresterung des Proteins mit einer spezifischen glycosidischen Seitenkette. Diese Seitenketten des Proteins dienen dem zielgerichteten Transport zu den Organellen.

Während der Ligninsynthese werden die in den Zellen gebildeten Coniferylalkohole glycosyliert und die Glycoside in Vesikeln zur Zellwand transportiert, wo nach erfolgter Hydrolyse der Glycoside die Kondensation zu Lignin stattfindet (IBRAHIM, 1977). Die Anbindung der Glucose erfolgt zur Stabilisierung während des Transportes der Moleküle. Auch im Stoffwechsel cyanogener Glycoside spielt der Grad der Glycosylierung eine wichtige Rolle beim Transport der Metabolite (SELMAR, 1988; 1993b). Nur durch Glucosylierung des Linamarins zum Linustatin kann das cyanogene Glucosid den Apoplasten passieren und über weite Strecken in der Pflanze transportiert werden. Das cyanogene Monoglucosid würde im Gegensatz zum Diglucosid von einer im Apoplasten lokalisierten β -Glucosidase gespalten. Diese wichtige Glucosylierungsreaktion wurde in der vorliegenden Arbeit an *Linum usitatissimum* durch eine *in vivo* Inkubation eindeutig nachgewiesen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Glycoside für die einzelne Zelle, bzw. die gesamte Pflanze von sehr großer Bedeutung sind. Die chemischen Eigenschaften der Glycoside, die sich in der Regel durch eine verminderte Reaktivität und eine gesteigerte Wasserlöslichkeit von ihren Aglyca unterscheiden, machen sie zu geeigneten speicherbaren, inaktiven Derivaten physiologisch aktiver Substanzen (CONN, 1984).

4.4 Aufnahme cyanogener Glycoside in Kulturen von *Linum usitatissimum*

4.4.1 Induktion der Zell- und Wurzelkulturen

Da für die Aufnahmestudien zunächst Zellsuspensionen und Wurzel-flüssigkulturen etabliert werden mussten, beschäftigten sich die ersten Untersuchungen mit dem Auffinden optimaler Bedingungen für das Anlegen der Suspensionskulturen. Dabei zeigte sich, dass die Wurzeln, die als Kulturen auf Agarmedium zu Verfügung standen, im Medium der gleichen Rezeptur auch in Flüssigkultur kultiviert werden konnten. Zur Etablierung einer Zellsuspensionskultur war es erforderlich zunächst die Faktoren für eine hohe Induktionsrate von Kallus festzustellen. Dabei hatten die Qualität und die Quantität der Phytohormone einen wesentlichen Einfluß.

Schaumann (1993) erreichte eine schnelle Bildung von Kallus aus *Linum usitatissimum* mit einem MS-Basalmedium, dessen Makronährelementkonzentrationen um die Hälfte reduziert waren und dem 4 µm Casein zugesetzt wurde. Als Phytohormone kamen für die Induktion und auch die spätere Zellsuspensionskultur in Flüssigmedium 2,4-D und Kinetin zum Einsatz.

In dieser Arbeit zeigte sich jedoch, dass mit dieser Medienzusammensetzung aus Leinpflanzen der Sorte Arion kein optimal wachsender Kallus induziert werden konnte. Hingegen wurde eine Induktion mit einem MS-Basalmedium und dem Einsatz von 2,4-D, Indolessigsäure, Kinetin und BAP erreicht. Für die spätere Subkultur des Kallus in Suspension war es problemlos möglich das gleiche Kulturmedium zu verwenden.

Street (1977) beschrieb das Wachstum einer Zellsuspension als abgeschlossenes System, das durch das Wachstum der Zellen und Wechselwirkungen

mit dem Kulturmedium einem ständigen Wandel unterworfen ist. Die Teilungsintensität ändert sich von der Inokulation bis zum Stillstand der Zellteilung mehrfach. Das Vorkommen und die Dauer der im Modell von Street dargestellten Wachstumsphasen ist abhängig von der Pflanzenart, der Frequenz der Subkultivierung, von der Zellmasse des Inokulates und dem eingesetzten Kulturmedium.

Die beiden in dieser Arbeit beschriebenen Suspensions- bzw. Flüssigkulturen zeigten den typischen Verlauf des von Street beschriebenen Zellzyklus. Die Suspensionskulturen wiesen eine lag-Phase, sowie eine Phase exponentiellen und eine linearen Wachstums auf. Allerdings wurde die Phase des Teilungsstillstands im beobachteten Zeitraum nicht erreicht. Dennoch deutete sich nach 18 Kulturtagen sowohl bei den Zell- als auch bei den Wurzelkulturen der Beginn der stationären Phase an.

4.4.2 Cyanogene Glycoside in Pflanzen, Zell- und Wurzelkulturen von *Linum usitatissimum*

In zahlreichen Pflanzen konnten cyanogene Glycoside nachgewiesen werden (CONN, 1991), unter denen sich viele Nutzpflanzen wie Bambus, Gerste, Hirse, Mais und Lein befinden (NARTEY, 1980). Die Konzentration dieser Verbindungen schwankt zwischen sehr hohen Gehalten bis zu Spuren dieser Glycoside, so dass die Pflanzen in stark cyanogene Gruppen und schwach cyanogene Gruppen eingeteilt werden. Dabei muss berücksichtigt werden, dass die Konzentration auch innerhalb einer Pflanze zwischen den einzelnen Organen oder Geweben sehr unterschiedlich sein kann. Wie die Daten in der vorliegenden Arbeit zeigten und wie auch Niedzwiedz-Siegien (1997) nachwies, enthalten Leinpflanzen in ihren vegetativen Organen nur geringe Mengen cyanogener Glycoside während die Samen sehr stark cyanogen sind. Da in der vorliegenden Arbeit nur Pflanzenorgane eines Entwicklungsstadiums untersucht worden sind, kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich der Gehalt cyanogener Glycoside in der Pflanze und die Verteilung über die einzelnen Organe abhängig vom Pflanzenalter verändern.

Während zahlreiche Untersuchungen zum Vorkommen cyanogener Glycoside in verschiedenen Pflanzen durchgeführt wurden (SEIGLER, 1991; MØLLER & SEIGLER, 1998) und auch Daten über diese Verbindungen in Tieren existieren (NAHRSTEDT, 1996), gibt es fast keine Information zum Auftreten dieser Substanzen in Zell- und Gewebekulturen. In der vorliegenden Arbeit wurden das Vorhandensein cyanogener Glycoside in Zell- und Gewebekulturen von *Linum usitatissimum* untersucht. Vor dem Hintergrund der in der Literatur beschriebenen Daten zum Vorkommen cyanogener Glycoside in Zell- und Gewebekulturen soll geklärt werden, welche Faktoren die Synthese dieser Sekundärstoffe in den Kulturen beeinflussen können und wodurch ein Nachweis der Blausäure freisetzenden Verbindungen weiterhin beeinflusst werden kann.

Die Arbeiten von Møller und Seigler zeigen, dass die Synthese und Akkumulation cyanogener Glycoside in Pflanzen in Abhängigkeit der Pflanzenart und von den Kulturbedingungen ganz unterschiedlich ausgeprägt sein können. In einer der ersten Untersuchungen über cyanogene Glycoside in Zellkulturen konnten Hösel et al. (1985) zeigen, dass in Suspensionskulturen des Kalifornischen Mohns (*Eschscholtzia californica*) cyanogene Glycoside nachweisbar sind. Allerdings finden sich nur in Kulturen, die durch Zusatz von Sorbitol zum Kulturmedium osmotisch gestresst wurden, cyanogene Glycoside. Diese detektierten Glycoside der Zellsuspensionskulturen sind nicht identisch mit den cyanogenen Glycosiden Dhurrin und Triglochinin, die in den entsprechenden Pflanzen vorliegen, sondern besitzen eine andere bislang noch nicht identifizierte Struktur. Im Gegensatz dazu wurden in den vorliegenden Untersuchungen in Zellkulturen aus *Linum usitatissimum* auch ohne osmotischen Stress der Zellen die gleichen cyanogenen Glycoside detektiert, wie sie auch in der Leinpflanze nachgewiesen wurden.

Jäger et al. (1995) wiesen nach, dass auch in Kalluskulturen der südafrikanischen Passifloraceae *Schlechteria mitostemmatoides* cyanogene Verbindungen vorhanden sind. Im Gegensatz zu den Zellkulturen von *Eschscholtzia* kommt in der Kalluskultur von *Schlechteria* die gleiche cyanogene Verbindung vor, wie in den intakten Pflanzen. Diese Befunde stellen jedoch in sich keinen Widerspruch dar: Denn während bei einer etablierten Zellsuspensionskultur die vorhandenen Verbindungen auf eine in der Zellkultur stattfindende *de novo*-Synthese

zurückzuführen sind, sollten in Kalluskulturen auch die Verbindungen vorhanden sein, die in den für die Kallusanlage genutzten Explanaten vorkommen. Da die Inhaltsstoffe allerdings im Zuge der Entwicklung auf den wachsenden Kallus verteilt werden, nimmt bei fehlender Synthese die Konzentration stetig ab.

Schnackenwinkel (1989) untersuchte das Blausäurepotential von Kallusgewebe aus Maniok nach der ersten und der zweiten Passage. Die Autorin konnte in beiden Kulturphasen in einigen Kalli cyanogene Glycoside nachweisen, in anderen jedoch nicht. Das Blausäurepotential lag in allen Fällen deutlich unter dem des Primärexplantates. Die nachgewiesenen Blausäure freisetzenden Verbindungen waren, wie im Fall von *Eschscholtzia californica*, nicht identisch mit den für Maniok charakteristischen cyanogenen Glycosiden.

Heidbrede (1999) konnte auch in aus Manioksprossen etablierten Zellsuspensionskulturen cyanogene Verbindungen bestimmen, deren Konzentration ebenfalls deutlich unter der intakter Maniokpflanzen lag. Heidbrede wies wie Schnackenwinkel eine cyanogene Verbindung nach, die nicht mit dem für Maniok typischen Linamarin übereinstimmte. Die Untersuchungen von Heidbrede und Schnackenwinkel zeigen, dass in diesen Kulturen verringerte Blausäurepotential nicht auf eine Ausdünnung der ursprünglich pflanzlichen cyanogenen Glycoside zurückzuführen ist, sondern eine geringe Synthese von Cyanglycosiden erfolgt, die eine andere chemische Struktur aufweisen. Eine Bildung der in den Maniokpflanzen vorkommenden cyanogenen Glycosiden findet nach einer Dedifferenzierung des Gewebes nicht mehr statt.

Istock (1987) hatte in Zellsuspensionskulturen der Mondbohne *Phaseolus lunatus* keine Biosynthese cyanogener Glycoside nachweisen können. Sie untersuchte Kallusgewebe schon vor der ersten Passage und konnte keine cyanogenen Verbindungen darin nachweisen. Die aus dem Kallus etablierten Suspensionen enthielten ebenfalls keine Blausäure freisetzenden Verbindungen.

Die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit zeigten, sowohl in Zell- als auch in Gewebekulturen von *Linum usitatissimum* cyanogene Verbindungen, die auch in intakten Leinpflanzen vorhanden waren. Allerdings lagen die in den

Zellsuspensionskulturen bestimmten Konzentrationen um ein Vielfaches unter den in Pflanzenorganen detektieren Gehalten. Auch in weiteren Leinvarietäten wurden Blausäure freisetzende Verbindungen bestimmt, deren chemische Strukturen allerdings nicht untersucht wurden.

Ein Vergleich der dargestellten Ergebnisse führt zu der Frage, warum in einigen Zell- oder Gewebekulturen keine cyanogene Glycoside nachgewiesen wurden, während andere Zell- und Gewebekulturen nachweislich cyanogenen Glycoside enthalten. Die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit wie auch in einigen der anderen Arbeiten zeigten, dass bei der Bestimmung von cyanogenen Glycosiden in Zell- und Gewebekulturen verschiedene Schwierigkeiten auftreten. So war ein positiver Nachweis Blausäure bildender Verbindungen in Zellsuspensionen von *Manihot esculenta* erst möglich, nachdem große Mengen Zucker aus den Zellextrakten entfernt wurden (HEIDBREDE, 1999). Dieser störende Einfluß auf die Blausäurebestimmung kann auch bei den Untersuchungen von Schnackenwinkel (1989) in den Zellsuspensionskulturen einen Nachweis verhindert haben. Diese Annahme wird auch durch die Bestimmung der Konzentrationen cyanogener Glycoside in Zell- und Gewebekulturen von *Linum usitatissimum* in dieser Arbeit bestätigt. Nur durch die Modifikation der Inkubationsmethode, die es ermöglichte die gebildete Blausäure in eine von der Inkubationslösung getrennte Natronlaugevorlage zu überführen, wurde ein Nachweis von Linamarin in den Kulturen erreicht. Dabei wurde durch Ansäuern des Inkubates die Blausäure aus der Inkubationslösung ausgetrieben und in der Natronlaugevorlage akkumuliert. Für den Cyanidtest konnte so die Natronlauge eingesetzt werden, die keine Störsubstanzen aus den konzentrierten methanolischen Zell- und Gewebeextrakten enthielt. Ein weiteres Problem bei der Bestimmung von Blausäure freisetzenden Verbindungen sind die zum Teil sehr geringen Konzentrationen, die häufig wesentlich niedriger ausfallen als in den dazugehörigen Primärexplantaten. Es ist somit wahrscheinlich, dass auch andere Zellsuspensionskulturen cyanogene Glycoside enthalten, die von den jeweiligen Autoren aufgrund der geringen Nachweisempfindlichkeit oder durch Störungen der Bestimmungsmethode nicht detektiert wurden.

Neben den methodischen Problemen kann es auch physiologische Ursachen haben, dass Zell- und Gewebekulturen geringe Gehalte an cyanogenen Glycosiden aufweisen: so könnte sowohl die Synthese verringert sein, als auch die Metabolisierung gesteigert sein. Die Regulation des Stoffwechsels der Sekundärstoffe spielt für den Gehalt in den Zell- und Gewebekulturen eine entscheidende Rolle. Die Synthese sekundärer Inhaltsstoffe kann wie die in dieser Arbeit vorliegenden Daten zu *Linum usitatissimum*, oder Untersuchungen an *Chenopodium rubrum* (HESS, 1995) oder *Datura stramonium* (BUTTERWORTH-HEINEMANN, 1993) zeigten, an bestimmte Wachstumsphasen gebunden sein. So bildete die Zellkultur von *Linum usitatissimum* in der vorgestellten Arbeit die höchste Konzentration cyanogener Glycoside während Phasen mit sehr geringer Wachstumsrate, wohingegen in Wurzelkulturen dieser Pflanze die höchsten Konzentrationen an cyanogenen Glycosiden in Phasen starker Zellvermehrung nachgewiesen wurden.

Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass die Synthese der Sekundärstoffe von Differenzierungsprozessen abhängig sind (BERLIN, 1988). Da die in Zellkulturen wachsenden, undifferenzierten Zellen eine Totipotenz besitzen und somit in der Lage sind, unter geeigneten Bedingungen zu einer vollständigen Pflanze zu regenerieren, unterliegen sie nicht mehr dem Einfluß, der in der Pflanze von differenzierten Gewebe ausgeht. Hirotani und Furuya (1977) berichteten, dass in Kallus und in Wurzelregeneraten aus Kallus von *Digitalis purpurea* keine Cardenolid-Synthese nachgewiesen werden konnte. Auch die Modifikation der Kulturbedingungen führte zu keiner Induktion der Cardenolid-Synthese. Dahingegen wurde in Blättern, die aus Kallus regeneriert wurden, die Synthese induziert. Die Synthese von Cardenoliden scheint in *Digitalis purpurea* an die Blattentwicklung gebunden zu sein, wie dies auch für cyanogene Glycoside in Zellkulturen von *Phaseolus lunatus* der Fall zu sein scheint (Istock, 1987).

Untersuchungen von Alkaloiden in *Datura innoxia* zeigten, dass ihre Bildung in Zellsuspensionskulturen deutlich geringer ausfiel. Die Scopolaminsynthese während der Wurzeldifferenzierung und der Pflanzenentwicklung führte in den Blättern zu einer Scopolaminkonzentration gleich der Konzentration in herkömmlichen Pflanzen (HIRAOKA & TABATA, 1974).

Die vorliegenden Ergebnisse zu den Gehalten cyanogener Glycoside in Zell- und Wurzelkulturen zeigten allerdings auch, dass ein höherer Grad an Differenzierung nicht zwangsläufig zu einer gesteigerten Sekundärstoffkonzentration führt. So besitzen die Wurzelkulturen von *Linum usitatissimum* weniger cyanogene Glycoside als die undifferenziert wachsenden Zellsuspensionen, obwohl die Wurzeln stärker differenziert sind als die Zellen der Suspensionskulturen.

Da die Wurzelkulturen eine räumliche Orientierung in ihrem Wachstum zeigen und somit älteres und jüngeres Gewebe von einander unterschieden werden können, kann es in den einzelnen Gewebeabschnitten zur unterschiedlichen Ausprägung der Synthese von cyanogenen Glucosiden kommen. Die Zellkulturen lassen es nicht zu, Zellen unterschiedlichen Alters zu differenzieren. In den Suspensionen verteilt sich eine Syntheseaktivität daher gleichmäßig über die gesamte Kultur. Als Ausblick für weitere Untersuchungen des Transports cyanogener Glycoside innerhalb von Geweben scheinen die Wurzelkulturen daher gut geeignet zu sein.

Die Regulation des Sekundärstoffwechsels wurde bereits an zahlreichen Suspensionskulturen von pharmazeutisch genutzten Pflanzen untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass in vielen Fällen die Bildung von Sekundärstoffen in Suspensionskulturen durch wachstumslimitierende Kulturbedingungen gesteigert werden kann (DiCosmo & Towers, 1984). Die Autoren verstanden diese erhöhte Bildung von Sekundärstoffen als Stressantwort der Kulturen und führten daher Untersuchungen mit Elicitoren und anderen stressauslösenden abiotischen Faktoren durch (DiCosmos & Misawa, 1985). Die Induktion der Glyceolin-Synthese bei der Interaktion von *Phytophthora megasperma f. sp. glycinea* und *Glycine max.* ist ein bekanntes Beispiel für eine Induktion durch Elicitoren (Grieesebach & Ebel, 1983).

An Zellkulturen wurden neben Elicitoren auch andere stressauslösende Kulturbedingungen untersucht. So stellten Rudat et al. durch Bestrahlung mit UV-Licht eine Betacyanbildung in Zellkulturen von *Chenopodium album* fest (1992) und Wellmann beobachtete eine Synthese von Flavonoiden in Zellsuspensionskulturen von *Petroselinum hortense*, ebenfalls ausgelöst durch eine UV-Lichtbestrahlung (1971).

Untersuchungen der Wirkung verschiedener Elicitoren auf Zellsuspensionskulturen von *Ruta graveolens*, *Catharantus roseus* und *Papaver somniferum* zeigten, dass alle Kulturen vorübergehend Sekundärstoffe vermehrt akkumulierten. Dabei wurde die Intensität der Reaktion auf die Elicitierung jedoch stark von der Kulturphase und der Art und Konzentration des Elicitors beeinflusst (EILERT, 1990).

Hösel (1981) erreichte die Induktion der Synthese cyanogener Glycoside durch osmotischen Stress in Zellkulturen des Kalifornischen Mohns *Eschscholtzia californica*. Hingegen konnte Heidbrede (1999) an Zellsuspensionskulturen verschiedener Genotypen von *Manihot esculenta* keine Induktion cyanogener Glycoside durch osmotischen Stress erreichen. Die hier untersuchten Zell- und Gewebekulturen von *Linum usitatissimum* wurden nicht durch osmotische Veränderung des Mediums oder Einsatz von Elicitoren gestresst, da bereits unter Standardbedingungen cyanogene Glycoside nachweisbar waren. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass durch derartige Stressoren eine Steigerung der Synthese möglich wäre.

4.4.3 Aufnahme und Transport cyanogener Glycoside in Zell- und Gewebekulturen

Pflanzliche Sekundärstoffe werden in der Regel in Bereichen gelagert, die nicht mit dem Biosyntheseort in der Zelle übereinstimmen. Dabei werden die meisten sekundären Inhaltsstoffe in der Zentralvakuole gelagert (MATILE, 1987). Darüber hinaus speichert sie eine Vielzahl osmotisch wirksamer Ionen und Metabolite (GUERN et al., 1987). Die Kompartimentierung von Synthese, Abbau und Lagerung der sekundären Pflanzenstoffe wird erreicht durch eine Reihe von integralen Prozessen, die hauptsächlich durch Membranen mit unterschiedlicher Permeabilität und physiko-chemischen Eigenschaften reguliert werden. Die Kontrolle von Transport und Lagerung spielt in der Pflanzenzelle eine Schlüsselfunktion, um die Produktion einer hohen Konzentration pflanzlicher Sekundärstoffe zu bewältigen (BARZ et al., 1981).

Für den Transport sekundärer Pflanzenstoffe durch die Plasmalemma und den Tonoplasten wurden verschiedene Mechanismen postuliert, die im weiteren genauer beschrieben werden sollen. Der Aufnahmemechanismus des Linustatins

aus dem Kulturmedium in die Zellen und Wurzeln der Suspensionskulturen soll mit diesen Beschreibungen verglichen werden, um so die Funktionsweise dieser Aufnahme zu erklären.

Ein möglicher Mechanismus für die Translokation von lipophilen Sekundärstoffverbindungen ist die einfache Diffusion. Eine wichtige Eigenschaft der einfachen Diffusion ist die direkte Abhängigkeit der Transportrate von dem Konzentrationsgradienten der Verbindung auf beiden Seiten der Membran. Der Transport von Metaboliten durch die einfache Diffusion erlaubt daher nicht den Aufbau eines Konzentrationsgradienten an einer Membran, aber der Mechanismus ermöglicht die Erklärung des Ausgleichs von Molekülen zwischen verschiedenen Kompartimenten. Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, dass pflanzliche Membranen für einige wichtige Metabolite und Sekundärstoffe, wie Cardenolide, Anthocyane und Alkaloide permeabel sind. So wiesen Mende und Wink (1987) die einfache Diffusion des Lupanins an Protoplasten von *Lupinus polyphyllus* nach. Kurkdjian (1982) zeigte die freie Passage von Nikotin am Plasmalemma von *Nicotiana tabacum* und *Acer pseudoplatanus*. Für *Digitalis lanata* wurde ein Transport von Digoxin und Digitoxin sowie deren Methylderivate durch das Plasmalemma in Form freier Diffusion beschrieben (KREIS & REINHARD, 1987).

Experimente von Deus-Neumann und Zenk (1986) bestätigten, dass mit Hilfe der freien Diffusion Verbindungen nicht nur in die Zellen aufgenommen werden, sondern auf diese Weise die Zellen auch verlassen können.

Ein weiterer Transportmechanismus neben der freien Diffusion, der für die Aufnahme von sekundären Inhaltsstoffen beschrieben wurde, ist die „Carrier“ vermittelte Translokation. Zahlreiche sekundäre, pflanzliche Inhaltsstoffe, darunter Alkaloide (DEUS-NEUMAN & ZENK, 1984), acylierte Anthocyane (HOPP & SEITZ, 1987) oder Cumarylglucoside wie Esculin (WERNER & MATILE, 1985), werden mit Hilfe von „Carriern“ durch den Tonoplasten in die Vakuole aufgenommen. Kreis und Reinhard (1987) zeigten für *Digitalis lanata* die Aufnahme von herzwirksamen Glycosiden durch einen „Carrier“ vermittelten Mechanismus. Die Autoren vermuteten diesen „Carrier“ im Tonoplasten, da die

Glycoside in der Vakuole akkumuliert werden und isolierte Vakuolen nicht in der Lage sind exogene Cardenolide aufzunehmen.

Das Vorhandensein von „Carriern“ kann dadurch demonstriert werden, dass die Aufnahme eine Sättigungskinetik beschreibt und eine Spezifität gegenüber dem Substrat aufweist. Außerdem kann die Aufnahme kompetitiv durch analoge Substrate gehemmt werden (REINHOLD & KAPLAN, 1984; STEIN, 1986). Für den Eintransport von Linustatin in die Zell- und Wurzelkulturen von *Linum usitatissimum* konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme spezifisch und gegen einen Konzentrationsgradienten erfolgt. Eine Substratsättigung des „Carriers“ wurde unter den gewählten Bedingungen jedoch nicht erreicht, auch eine kompetitive Hemmung der Aufnahme wurde durch die eingesetzten Glycoside nicht bewirkt. Dabei muss allerdings berücksichtigt werden, dass diese Glycoside alle eine andere Aglycastruktur aufweisen und somit von dem „Carrier“ eventuell nicht transportiert werden.

Der Beweis eines spezifischen „Carriers“ ist nicht gleichzeitig ein Beleg für einen aktiven Transport der Verbindung in die Zelle oder in die Vakuole. Vielmehr erfordert ein aktiver Transportmechanismus die Kopplung des Transportes an einen energieliefernden Prozess und die Verlagerung der Verbindung über die Grenzschicht gegen das elektrochemische Potenzial (RENAUDIN & GERN, 1982). Ein Beweis für einen aktiven Transport ist daher in der Aufnahme einer Verbindung in ein Kompartiment aus einer geringeren Konzentration außerhalb des Kompartimentes zu sehen. In der Regel kann ein Energieverbrauch auch durch eine erfolgreiche Stimulation durch ATP-Mg²⁺ beobachtet werden oder durch die Wirkung eines ATP-Synthetase-Inhibitors.

Häufig wurde bei einem aktiven Transport die Bewegung von Protonen beobachtet, so wurde ein H⁺-Antiport-Carrier am Tonoplasten für den Transport von Vindolin (DEUS-NEUMANN & ZENK, 1984), (S)-Reticulin (DEUS-NEUMANN & ZENK, 1986), Lupanin (MENDE & WINK, 1987) und Esculentin (WERNER & MATILE, 1985) postuliert.

Für den Transport von Linustatin in die Zellen und Wurzel von *Linum usitatissimum* wurde in der vorliegenden Arbeit kein Einfluß durch die Protonenkonzentration des Mediums beobachtet, da die Konzentration des im

Medium verbliebenen Linustatins unverändert blieb. Jedoch wurde gezeigt, dass angebotenes Linustatin in einer Konzentration in die Zellen und Wurzeln aufgenommen wurde, die deutlich über der endogenen Konzentration lag, vor allem aber weit über der Konzentration des ins Medium applizierten Linustatins. Das den Zellkulturen applizierte Linustatin wurde zunächst in Richtung des Konzentrationsgefälles transportiert, mit steigender Konzentration in den Zellen erfolgte jedoch später auch gegen den Gradienten ein Transport in die Zellen und Wurzeln der Suspensionskulturen. Damit ist sehr wahrscheinlich, dass Linustatin durch einen „aktiven Carrier“ in die Zellen transportiert wird. Zu Beginn des Einstromes von Linustatin in die Suspensionskulturen kann neben dem Carrier vermittelten Transport auch eine einfache Diffusion des cyanogenen Glycosides erfolgen.

Für verschiedene sekundäre Inhaltsstoffe wurde beobachtet, dass nach der Aufnahme eine Rückhalterreaktion stattfindet, durch welche die Metabolite die Zelle und die Vakuole nicht wieder verlassen können. So wurden Ionisationen von Metaboliten verzeichnet (RENAUDIN, 1989) oder die Glycosylierung von Verbindungen durch ein an den Tonoplasten gebundenes Enzym festgestellt (CONN, 1984). Neben diesen Mechanismen wurden noch weitere Formen des Rückhaltens aufgenommener Metabolite beschrieben, so die *cis-trans*-Isomerisierung (RATABOUL et al., 1985), eine Bindung an Polyphosphate (CRAMER & DAVIS, 1984), die Komplexierung mit Magnesiumionen (MARIN et al., 1982) oder die Kristallisation (NAGAKAWA et al., 1984). Untersuchungen haben allerdings auch gezeigt, dass diese Reaktionen durch enzymatische Katalyse prinzipiell reversibel sind und die Metabolite die Vakuole oder die Zelle wieder verlassen können (MEND & WINK, 1987). In der vorliegenden Arbeit wurde dargestellt, dass auch Linustatin, welches in die Zellen aufgenommen wurde, zu Linamarin metabolisiert wird. Das Rückhalten dieser Verbindung erfolgt allerdings nicht quantitativ, ein Teil des Linamarins wird ins Medium entlassen. Um die Ursachen dieser Freigabe von Linamarin zu erklären wird dieser Befund vor dem Hintergrund in der Literatur beschriebener Sekundärstoffabgaben in das Medium betrachtet.

Viele Sekundärstoffverbindungen, häufig Alkaloide, aber auch Terpenoide, Anthrachinone, Naphtochinone und Phenole wurden in unterschiedlichen Konzentrationen als Ausscheidungsprodukt der Zellen im Kulturmedium nachgewiesen (PARR et al., 1987; GUERN et al., 1987). Während der Einstrom von Sekundärstoffen schon zahlreich untersucht wurde, liegen über die Abgabe dieser Verbindungen nur wenige Daten vor. Im Fall einiger lipophiler Verbindungen wurde die einfache Diffusion als Transportmechanismus diskutiert (YAMAMOTO et al., 1987). Ferner hat die Art der Zellen und auch die Wachstumsphase einen großen Einfluss auf die Abgabe der Verbindungen. So schwankt die Ausscheidung von Berberin in Zellsuspensionskulturen, die bei 17 verschiedenen *Thalictrum minus* Pflanzen induziert wurden, zwischen 23 und 100 % des Gesamtgehaltes des in der Kultur vorkommenden Berberins (SUZUKI et al., 1987). Für Suspensionskulturen von *Thalictrum minus* wurde außerdem festgestellt, dass Berberin während der gesamten Wachstumsphase ausgeschieden wurde, wohingegen Zellen von *Thalictrum dipterocarpum* (NAGAKAWA et al. 1984) Berberin nur während der logarithmischen Wachstumsphase freisetzen (SUZUKI et al., 1988).

Im Gegensatz zur Konzentration des aus dem Medium aufgenommenen Linustatins wurde die Konzentration des akkumulierten Linamarins von dem pH-Wert im Medium sowohl bei den Zellen als auch bei den Wurzeln beeinflusst. So zeigten die Zellen der Suspensionskultur bei einem neutralen pH-Wert des Mediums eine um 15 % höhere Linamarinkonzentration gegenüber den Zellen der Medien mit saurem pH-Wert. Die Wurzeln dahingegen besitzen bei einem pH-Wert von 5,5 die höchste Linamarinkonzentration gegenüber Medien mit pH-Werten von 7, pH 4,8 und pH 4. Diese Ergebnisse lassen für das Freisetzen von Linamarin aus den Zellen und Wurzeln von *Linum usitatissimum* in das Medium vermuten, dass es durch eine einfache Diffusion oder durch einen unspezifischen Carrier erfolgt. Die Plasmamembranen der Zellen und Wurzeln, die sich in ihren strukturellen Aufbau unterscheiden können, da sie von unterschiedlichen Ursprungsgewebe ausgehen, werden durch die pH-Werte unterschiedlich physikochemisch verändert, so dass der Austritt des Linamarins beeinflusst wird.

Die Aufnahme des cyanogenen Diglucosides, das in den Leinpflanzen als Transportmetabolit fungiert, erfolgt in die Zell- und Wurzelkulturen mit hoher

Geschwindigkeit, und auch eine Spaltung des Transportmetaboliten durch eine nachgewiesene Diglucosidase zu Linamarin findet statt. Da das gebildete Linamarin jedoch nicht vollständig akkumuliert wird, sondern teilweise zurück ins Medium entlassen wird, scheint in den Zell- und Wurzelkulturen im Gegensatz zu den Leinpflanzen der Eintransport des Linamarins in die Vakuole gestört zu sein. Ein Einfluß des Tonoplasten durch den pH-Wert des Mediums wie im Fall der Plasmalemma kann dabei ausgeschlossen werden, da kein direkter Kontakt besteht. Wie die Daten zum Vorkommen cyanogener Glucoside in Zell- und Wurzelkulturen von *Linum usitatissimum* zeigen, kommt es nur zur Bildung einer gegenüber den Leinpflanzen geringen Konzentration cyanogener Glycoside, so dass auf eine nur schwache Aktivität der Enzyme zur Synthese geschlossen werden kann. Auch die Aktivität der für den Linamarin Eintransport nötigen Translokatoren ist vermutlich wie die Enzyme der Synthese nur gering. Das im Cytosol befindliche Linamarin kann auf diese Weise nicht akkumuliert werden und verläßt die Zelle durch unspezifische Carrier oder durch einfache Diffusion. Aufnahmestudien an Kotyledonen von *Hevea brasiliensis* (Selmar, 1992) bestätigen diese Vermutung, denn in diesen Versuchen wurde den Kotyledonen Linustatin appliziert, das in die Zellen aufgenommen und dort auch akkumuliert wurde. In den intakten Geweben der *Hevea* Keimblätter ist der Aufnahme- und Akkumulationsmechanismus vollständig intakt.

Ein Vergleich der in Literatur beschriebenen Eigenschaften verschiedener Aufnahmemechanismen mit den Ergebnissen der in dieser Arbeit durchgeführten Aufnahmeuntersuchungen von Linustatin in Zellsuspensions- und Wurzel-flüssigkulturen führt zu folgender Schlußfolgerung Linustatin wird gegen den Konzentrationsgradienten durch einen „aktiven Carrier“ in die Zellen und Wurzeln der Kulturen aufgenommen, dabei kann kein Einfluß des pH-Wertes festgestellt werden. Die Akkumulation des in den Zellen gebildeten Linamarins scheint dagegen gestört zu sein, als Folge von fehlenden Translokatoren in der Tonoplastenmembran.

5 Zusammenfassung

Fragestellung:

Der Stoffwechsel cyanogener Glucoside wurde an unterschiedlichen Pflanzen untersucht, dabei hat sich die Mehrzahl der Arbeiten auf *Sorghum bicolor* (Conn), *Prunus serotina* (Møller), *Linum usitatissimum* (Selmar) und *Hevea brasiliensis* (Selmar) konzentriert. Besonders die Arbeiten am Kautschukbaum (*Hevea brasiliensis*) haben zur Aufklärung der Verlagerung cyanogener Glucoside, wie Linamarin und Linustatin, beigetragen. Dabei steht das cyanogene Diglucosid Linustatin als Transportmetabolit an einem wichtigen Verzweigungspunkt im Stoffwechsel von *Hevea brasiliensis* zwischen Verlagerung und anschließender Akkumulation oder Transport und vollständiger Metabolisierung. Ungeklärt blieben jedoch Fragen zur Aufnahme der cyanogenen Mono- und Diglucoside aus dem Apoplasten in die Zellen und zur Bildung des Transportmetaboliten Linustatin aus dem gespeicherten Linamarin durch eine entsprechende Glucosyltransferase.

Ziel dieser Arbeit war es daher die Glucosylierung zum Transportmetaboliten Linustatin aus dem Monoglucosid Linamarin und damit das Vorkommen einer Linamarin:Glucose-Glycosyltransferase in Leinsamen eindeutig zu klären. Desweiteren sollte der Import von cyanogenen Glycosiden in pflanzliche Zell- und Gewebekulturen erfasst und grundsätzliche Aussagen zu dessen Mechanismus erarbeitet werden.

Die Experimente und Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit lassen sich daher in zwei Abschnitte gliedern.

Ergebnisse:

Im ersten Teil der Arbeit wurde zunächst die Entwicklung von Leinsamen und der Gehalt sowie das Spektrum der cyanogenen Glucoside in diesen Samen verglichen. Daraufhin wurden für die Bestimmung der Glucosyltransferase 12 Tage alte Leinsamen als optimal geeignetes Pflanzenmaterial ausgewählt.

Der erfolgreiche Nachweis der Aktivität einer Linamarin:Glucose-Glycosyltransferase gelang durch eine *in situ* Inkubation, bei der die Kompartimentierung in den Zellen intakt blieb. Als Substrat wurden den Samen radioaktiv markierte

Triosen als eine Glucosevorstufe angeboten, die *in situ* aus [U]¹⁴C Fructose-1,6-bisphosphat dargestellt wurden. Die Untersuchungen der Radioaktivität des Linustatins nach der Inkubation zeigten, dass die Triosen mit großer Effektivität in das Linustatin eingebaut wurden. Die anschließende Hydrolyse dieses Linustatins mit einer sequentiellen Diglucosidase, die aus *Hevea brasiliensis* isoliert wurde (Hillmar, 1999) und Linustatin zu Linamarin und Glucose spaltet, zeigte, dass nur die terminale Glucose des Linustatins markiert war. Das extrahierte Linamarin, das aus dem Linustatin hervorging, war in der Aglycon gebundenen Glucose nicht radioaktiv markiert. Die Markierung des Linustatins ausschließlich in der terminalen Glucose zeigte, dass das Diglucosid während der Inkubation mit den radioaktiven Triosen aus dem bereits vorher existierenden Linamarin gebildet worden war.

Die Markierung des Linustatins beweist damit, dass in Leinsamen eine Glycosyltransferase vorkommt, die Linamarin zu Linustatin glycolysiert.

Der zweite Teil der Untersuchungen beschäftigt sich mit dem Transport von cyanogenen Glucosiden in die Zellen. Diese Experimente zur Aufnahme von cyanogenen Glucosiden erfolgten an Zell- und Wurzelsuspensionskulturen, die im Rahmen dieser Arbeit etabliert und charakterisiert wurden. Zum Anlegen einer Zellsuspensionskultur wurde Kallus aus Sprossabschnitten steriler Leinpflanzen induziert und in Suspensionskultur transferiert. Für Aufnahmeversuche an Gewebekulturen standen transformierte Wurzelkulturen zur Verfügung, die in Suspension übertragen wurden.

Das Wachstum dieser beiden Suspensionskulturen, deren Verlauf einem von Street (1977) beschriebenen Wachstumszyklus folgte, wurde durch die Erfassung verschiedener Wachstumsparameter charakterisiert.

Untersuchungen zu Vorkommen und Spektrum cyanogener Glycoside zeigten, dass sowohl in Zell- als auch in Wurzelsuspensionen das cyanogene Glycosid Linamarin auftritt, wohingegen Linustatin nicht detektiert werden konnte.

Ferner wurden die Zell- und Gewebekulturen daraufhin untersucht, ob sie einige der am Cyanidstoffwechsel beteiligten Enzyme enthielten. So wurde die Aktivität einer Linamarin- und einer Linustatin-hydrolysierenden β -Glucosidase bestimmt. Bei der Untersuchung der Linamarase und Linustatinase kam der zellulären Lokalisation dieser Enzyme besondere Bedeutung zu. Dabei zeigten

Untersuchungen von Kulturmedium und präparierten Protoplasten, dass beide Enzyme, anders als in der intakten Leinpflanze, vollständig symplastisch lokalisiert sind.

Auf der Basis dieser Ergebnisse wurden Zell- und Wurzelkulturen mit Linustatin inkubiert. Diese Experimente lassen die Schlussfolgerung zu, dass Linustatin aktiv durch einen Carrier in die Zellen und Wurzeln der Suspensionskulturen aufgenommen wird. Untersuchungen, bei denen der pH-Wert des Mediums variiert wurde, zeigten, dass eine geringere Protonenkonzentration bei den Zellkulturen zu einer gesteigerten Linustatin-Aufnahme führte. Diese Daten deuten auf eine Aufnahme des Linustatins im Antiport mit Protonen hin. Eine Konkurrenz der Aufnahme durch weitere cyanogene und nicht cyanogene Glycoside konnte nicht beobachtet werden, allerdings führte eine Coinkubation mit weiteren Glycosiden zu einer geänderten Rückhaltung des Linamarins in den Zellen. Es wurde eine bis zu 30 % geringere Linamarinkonzentration in den Zellen bestimmt.

6 Literaturverzeichnis

- Abrol, Y., Conn, E.E. und Stocker, J.R. (1966): Studies on the Identification, Biosynthesis and Metabolism of a Cyanogenic Glucoside in *Nandina domestica* Thub.
Phytochem. 5, 237-242
- Adamon, A. und Jacoby, B. (1980): Assessment of Cytoplasmatic Contaminations in Isolated Vacuole Preparations.
Plant.Physiol. 65, 85-87
- Adewusi, S.R.A. (1990): Turnover of Dhurrin in Green Sorghum Seedlings.
Plant Physiol. 94, 1219-1224
- Aldrige, W.N. (1944): A new Method for the Estimation of Microquantities of Cyanide and Thiocyanide
Analyst 69, 262-265
- Bahn, A. (1992): Cyanogene Glucoside und Glucosidasen in Keimlingen vom *Linum usitatissimum* L.
Diplomarbeit, Naturwissenschaftliche Fakultät, TU Braunschweig
- Barz, W., und Köster, J. (1981): Turnover and degradation of secondary (natural) products.
In Biochemistry of Plants, Vol 7: Secondary Plant Products (ed. Conn, E.E. Academic Press ISBN 0-12-675407-1) 35-84
- Beck, E. und Hopf, H. (1982): Carbohydrate Metabolism.
Fortschritte der Botanik 44, 132-153
- Bediako, M.K.B., Trapper, B.A., und Pritchard, G.G. (1981): Metabolism, synthetic site and translocation of cyanogenic glycosides in Cassava. In Tropic Root Crops: Research strategies for the 1980s (eds. Terry, E. R., Oduro, K. A., Caveness, F. – International Development Research Centre, Ottawa, Canada): 143-148
- Bergmeyer, H.U. (1970): Methoden der enzymatischen Analyse.
Verlag Chemie, Weinheim
- Berlin, J. (1988): Medicinal and aromatic plants I.
In Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 4, Springer Verlag Heidelberg
- Blumentahl, S. G., Butler, G. W. und Conn, E. E. (1963): Incorporation of hydrocyanic acid labelled with carbon-14 into asparagine in seedlings.
Nature 197, 718-719
- Boller, T. und Wiemken, A. (1986): Dynamics of vacuolar compartmentation.
Ann. Rew. Plant Physiol. 37, 134-164

- Boudet, A.M., Alibert, G. und Marigo, G. (1984): Vakuoles and tonoplast in the regulation of cellular metabolism.
Annual Proceedings of the Phytochemical Society of Europe 24, 28-47
- Bough, W.A. und Gander, J.E. (1971): Exogenous L-Tyrosine metabolism and Dhurrin turn-over in *Sorghum* seedlings.
Phytochem. 72, 248-254
- Brinker, A. und Seigler, D.S. (1989): A new cyanogenic glycoside from *Lotononis falcata*.
Phytochemical Society of North America Newsletter 29: 29th PSNA-Meeting, paper 2/6.26
- Butler, G.W. (1965): The Distribution of the cyanoglucosides linamarin and lotaustralin in higher plants.
Phytochemistry 14, 993-997
- Butterworth-Heinemann (1993): In vitro cultivation of plant cells.
BIOTOL-Biotechnology by Open Learning
- Canut, H., Alibert, G. und Boudet, A.M. (1985): Hydrolysis of intracellular proteins in vacuoles isolated from *Acer pseudoplatanus* cells.
Plant Physiol. 79, 1090
- Castric, P.A., Farnden, K.F. und Conn, E.E. (1972): Cyanide metabolism in higher plants 5: The formation of asparagine from β -cyanoalanine.
Arch. Biochem. Biophys. 152, 62-69
- Chew, M.Y. (1973): Rhodanase in higher plants.
Phytochemistry 12, 2365-2367
- Clegg, D.O., Conn, E.E. und Janzen, D.H. (1979): Developmental fate of the cyanogenic glucoside linamarin in Costa Rican Wild Lima Bean seeds.
Nature 278, 343-344
- Conn, E.E. (1980) : Cyanogenic Compounds.
Ann. Rev. Plant Physiol. 31, 433-439
- Conn, E.E. (1981) : Biosynthesis of cyanogenic Glycosides. In: Cyanide in Biology (Hreg. B. Vennesland et al.), S. 183 ff. Academic Press, London
- Conn, E.E. (1984): Compartmentation of secondary compounds. In: Annual Proceedings of the Phytochemical Society of Europe: Membranes and Compartmentation in regulation of plant functions. (Hrsg. A.M. Boudet et al.) Vol. 24, 1-28. Oxford Press, Oxford
- Conn, E.E. (1991): Metabolic Studies on Natural Products: Cyanogenic glycosides and cyanogenesis as possible models.
Proc. of the National Science Council Part B: Life Sciences Vol. 15, No. 4, 220-225

- Cramer, C.L. und Davis, R.H. (1984): Polyphosphate-cation interaction in the aminoacid-containing vacuole of *Neurospora crassa*.
Journal of Biological Chemistry 259, 5152-5157
- Cutler, A.J. und Conn, E.E. (1981): The biosynthesis of cyanogenic glucosides in *Linum usitatissimum* (linen flax) *in vitro*.
Archives of Biochem. Biophys. 212, 2, 468-474
- Cutler, A.J., Sternberg, M. und Conn, E.E. (1985): Properties of a microsomal enzyme system from *Linum usitatissimum* (linen flax) which oxidizes valine to acetone cyanohydrin and isoleucine to 2-methylbutanone cyanohydrin
Arch. Biochem. Biophys. 238 (1), 272-279
- Deus-Neumann, B. und Zenk, M.H. (1984): A highly selective alkaloid uptake system in vacuoles of higher plants.
Planta 162, 250-260
- Deus-Neumann, B. und Zenk, M.H. (1986): Accumulation of alkaloids in vacuoles does not involve an ion-trap mechanism.
Planta 167, 44-53
- DiCosmo, F. und Towers, G.H.N. (1984): Stress and metabolism in cultured cells. In: Phytochemical adaptation to stress. (eds. Timmermann, B.A., Steelink, C. und Loewus, F.A., Plenum, New York) 97-175
- DiCosmos, F. und Misawa, M. (1985): Eliciting secondary metabolism in cultured cells.
Trends Biotechnol. 3, 318-322
- Dixon, S.C., Martin, R.C., Mok, M.C., Shaw, G. und Mok, D.W.S. (1989): Zeatin glycosylation enzymes in *Phaseolus*
Plant Physiol. 90, 1316-1321
- Eilert, U. (1990): Elicitor-Induktion des Sekundärstoffwechsels in pflanzlichen Zellkulturen und differenzierten *in vitro*-Systemen.
Habilitationsschrift der TU Braunschweig
- Erickson, R.O. (1986): Growth and symplastic transport
Plant Physiol. 82, 1153
- Fan, T.W.M. und Conn, E.E. (1985): Isolation and characterization of two cyanogenic β -glucosidases from flax seeds.
Arch. Biochem. Biophys. 243 (2), 361-373
- Frehner, M. und Conn, E.E. (1987): The linamarin β -glucosidase in Costa Rican Wild Lima beans (*Phaseolus lunatus*) is apoplasmic.
Plant Physiol. 84, 1296-1300

- Frehner, M., Scalet, M. und Conn. E.E. (1990): Pattern of the cyanidepotential in developing fruits
Plant Physiol. 94, 28-34
- Frey-Wissling, A. (1942): Zur Physiologie der pflanzlichen Glucoside.
Naturwissenschaften 30, 500
- Gamborg, O.L., Muller, R.A. and Ojima, K. (1968) : Nutient requirements of suspension culture of soybean root cells.
Exp. Cell. Res. 50, 151-158
- Griesebach, H. und Ebel, J. (1983): Biologie in unserer Zeit 13, 129-136
- Gruhnert, Ch., Biehl, B. und Selmar, D. (1994): Compartmentation of cyanogenic glucosides and their degrading enzymes.
Planta 195, 36-42
- Guern, J., Renaudin, J.P. und Brown, S.C. (1987): The compartmentation of secondary metabolites in plant cell culture. In: Cell culture and somatic cell genetics of plants, Vol. 4 (ed. Constabel, F. und Vasil, I.K.), Academic Press, San Diego 43-76
- Hahlbrock, K. und Conn, E.E. (1970): The biosynthesis of cyanogenic glycosides in higher plants. I. Purifikation and properties of a uridine diphosphat-glucose-ketone cyanhydrin β -glucosyltransferase from *Linum usitatissimum* L.
J. Biol. Chem. 245, 917-922
- Halbrock, K. und Conn; E.E. (1971): Evidence for the formation of linamarin and lotaustralin in fax seedlings by the same glucosyltransferase.
Phytochem. 10, 1019-1023
- Halkier, B.A. und Møller, B.L. (1989): Biosynthesis of cyanogenic glucoside dhurrin in seedlings of *Sorghum bicolor* (L.) Moench and partial purification of the enzyme system involed.
Plant Physiol. 90, 1552-1559
- Halkier, B.A., Lykkesfeldt, J. und Møller, B.L. (1991): The biosynthesis of cyanogenic glucosides in higher plants. Identification of three hydroxylation steps in the biosynthesis of dhurrin in seedlings of *Sorghum bicolor* (L.) Moench and the involvement of 1-*aci*-nitro-2-(p-hydroxyphenyl)-ethane as intermediate.
J. Biol. Chem. 265, 21114-21121
- Heck, U., Martinoia, E. und Matile, P. (1981): Subcellular localization of acid proteinase in barley mesophyll protoplasts.
Planta 151, 198-200
- Heidbrede, M. (1999): Etablierung und Charakterisierung von Zellkulturen aus Blättern und Stengeln von Maniok (*Maniok esculenta* Crantz).
Diplomarbeit, Naturwissenschaftliche Fakultät TU Braunschweig

- Henges, A. (1999): Biosynthese und Kompartimentierung von Lignanen in Zellkulturen von *Linum album*
Dissertation, Universität Düsseldorf
- Heß, D. (1995): Biotechnologie der Pflanzen.
Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart
- Hillmar, S. (1999): Die Spaltung cyanogener Diglucoside: Reinigung und Charakterisierung von Diglucosidasen aus *Hevea brasiliensis* und *Davallia bullata*.
Dissertation, Naturwissenschaftliche Fakultät TU Braunschweig
- Hiraoka, N und Tabata, M. (1974): Alkaloid production by plants regenerated from cultured cells of *Datura innoxia*.
Phytochemistry 13, 1671-1675
- Hirotsu, N. und Furuya, T. (1977): Restoration of cardenolide-synthesis in redifferentiated shoots from callus cultures of *Digitalis purpurea*.
Phytochemistry 16, 610-611
- Hopp, W. und Seitz, H.U. (1987): The uptake of acylated anthocyanin into isolated vacuoles from a cell suspension culture of *Daucus carota*.
Planta 170, 74-85
- Hösel, W., Berlin, J., Hanzlik, T.N. und Conn, E.E. (1985): In-vitro biosynthese of 1-(4'-hydroxyphenyl)-2-nitroethane and production of cyanogenic compounds in osmotically stressed cell suspension cultures of *Eschscholtzia californica*.
Planta 166, 176-181
- Hösel, W. (1981) : Enzymatic Hydrolysis of cyanogenic glycosides. In: Cyanid in Biology (eds. Vennesland, B. et al.), Academic Press, ISBN 0-12-716980-6 , 217-232
- Hrazdina, G., Wagner, G.J. und Siegelman, H.W. (1978): Subcellular lokalisation of enzymes of anthocyanin biosynthesis in protoplasts.
Phytochemistry 17, 53-56
- Hughes, M.A. (1981): The genetic control of plant cyanogenesis. In: Cyanid in Biology (eds. Vennesland, B. et al.) Academic Press, London, 495-508
- Ibrahim, R.K. (1977): Glucosylation of lignin precursors by UDP-glucose:coniferyl alcohol Glucosyltransferase in higher plants.
Z. Pflanzenphys. 85, 253-262
- Ingold, E. und Seitz, H.U. (1986): Characterization and properties of different glucosyltransferases isolated from suspension cultured cells of *Daucus carota*
Z. Naturforsch. 41c, 409
- Istock, U. (1987): Anlage von Zellsuspensionskulturen der cyanogenen Bohne *Phaseolus lunatus*. – Studien zum Verlust des cyanogenen Potentials.
Diplomarbeit, Naturwissenschaftliche Fakultät TU Braunschweig

- Istock, U., Lieberei, R. und Harms, H. (1990): Pattern of the enzymes involved in cyanogenesis and HCN-metabolism in cell cultures of *Phaseolus lunatus* L. varieties.
Plant Cell, Tissue and Organ Culture 22, 105-112
- Jäger, A.K., McAlister, B.G. und Staden, J. (1995) : Cyanogenic glycosides in leaves and callus cultures of *Schlechterina mitostemmatoidea*.
S. Afr. J. Bot. 61 (5), 274-275
- Kahn, R.A., Bak, S., Svendsen, I., Halkier, B.A. und Moller, B.L. (1997): Isolation and reconstitution of cytochrome P_{450,ox} and in vitro reconstitution of the entire biosynthetic pathway of cyanogenic glucoside, dhurrin, from *sorghum*.
Plant Physiol. 115, 1661-1670
- Kakes, P. (1985): Linamarase and other function β -glucosidases are present in the cell walls of *Trifolium repens* leaves.
Planta 166, 156-160
- Kakes, P. (1990): Properties and function of the cyanogenic system in higher plants.
Euphytica 48, 25-43
- Kakes, P. und Hakvoort, H. (1992): Is there rhodanase activity in plants?
Phytochemistry 31, 1501-1505
- Kalinowska, M. und Wojciechowski, Z. (1987): Subcellular localization of UDPG-nuatigenein glucosyltransferase in Oat leaves.
Phytochem. 26 (2) 353-357
- Kamsteeg, J., van Brederode, J. und Nigtevecht G. (1987): Identification and properties of a UDP-glucose: cyanidin 3-O-glucosyltransferase isolated from petals of Red Campion (*Silene dioica*).
Biochem. Genetics 16, 1045-1058
- Katsumata, T., Shige, H. und Ejiri, S.I. (1989): UDP glucose: 4-(β -D-glucopyranosyloxy) benzoic acid glucosyltransferase from the pollen of *Pinus densiflora*.
Phytochem. 28, 359-362
- Keller, F., Matile, P. und Wiemken, A. (1986): Distribution of saccharides between cytoplasm and vacuole in protoplasts. In: The physiological properties of plant protoplasts (eds. Pilet, E.), Springer Verlag Heidelberg, 116-121
- Kojima, M., Poulton, J.E., Thayer, S.S. und Conn, E.E. (1979): Tissue distribution of dhurrin enzymes involved in its metabolism in leaves of *Sorghum bicolor* L.
Plant Physiol. 63, 1022-1028
- Kreis, W. und Reinhard, E. (1987): Selective uptake and vacuolar storage of primary cardiac glucosides by suspension-cultured *Digitalis lanata* cells.
Journal of Plant Physiol. 128, 311-326

- Kurkdjian, A. (1982): Absorption and accumulation of nicotine by *Acer pseudoplatanus* and *Nicotiana tabacum* cells.
Physiologie Végétale 20, 73-83
- Kurzhals, C., Grützmacher, H., Selmar, D. und Biehl, B. (1989): Linustatin, the linamarin-glucoside protected against cleavage by apoplastic linamarase.
Planta Medica 55, 673
- Kurzhals, C., Jentsch, D. und Selmar, D. (1992): Linustatin, the transport metabolite of linamarin?
Plant Physiology 99 (1), 141
- Kurzhals, C. (1993): Stoffwechsel cyanogener Glucoside in *Hevea brasiliensis*: Transport und Kompartimentierung
Dissertation, Naturwissenschaftliche Fakultät TU Braunschweig
- Leigh, R.A. (1983): Methods, progress and potential for use of isolated vacuoles in studies of solute transport in higher plant cells.
Physiol. Plant. 57, 390-396
- Lieberei, R. (1984): Cyanogenese und Resistenz.
Habilitationsschrift, Naturwissenschaftliche Fakultät TU Braunschweig
- Lieberei, R., Selmar, D. und Biehl, B. (1985): Metabolization of cyanogenic glucosides in *Hevea brasiliensis*.
Pl. Syst. Evol. 150 49-63
- Lieberei, R. (1988): Relationship of cyanogenic capacity (HCN-c) of the rubber tree *Hevea brasiliensis* to susceptibility to *Microcyclus ulei*, the agent causing South America leaf blight.
J. Phytopath. 122, 54-67
- Lieberei, R. und Selmar, D. (1990): Determination of rhodanase in plants.
Phytochemistry 29, 1421-1424
- Loyd, R.C. und Gray, E. (1970): Amount and distribution of hydrocyanic acid potential during the life cycle of plants.
Agron. J. 62, 394-397
- Lüdtke, M. (1952): Über das Linamarin des Leinsamen und seine Bestimmung
Biochem Z. 322, 310-322
- Maretzki, A. und Thom, M. (1988): High performance liquid chromatography - based reevaluation of disaccharides produced upon incubation of sugarcane vacuoles with UDP-glucose.
Plant Physiol 88, 266-269
- Marin, B., Crétin, H. und d'Auzac, J. (1982): Energetization of solute transport and accumulation at the tonoplast level in *Hevea latex*.
Physiologie Végétale 20, 333-346

- Matile, P. (1978): Biochemistry and function of vacuoles.
Annu. Rev. Plant Physiol. 29, 193-213
- Matile, P. (1987): The sap of plant cells.
New Phytologist 105, 1-26
- Martey, F., Branton, D. und Leigh, R.A. (1980): Plant vacuoles. In: The biochemistry of plants. (eds. Stumpf, P.K. und Conn, E.E.) Vol. I, Academic Press New York, 625-658
- Mederacke, H. (1995): Biosynthese cyanogener Glucoside: Glucosyltransferasen in Maniok (*Manihot esculenta* Crantz).
Dissertation, Naturwissenschaftliche Fakultät TU Braunschweig
- Mende, P. und Wink, M. (1987): Uptake of the quinolizidine alkaloid lupanine by protoplasts and isolated vacuoles of suspension-cultured *Lupinus polysphyllus* cells. Diffusion or carrier-mediated transport?
J. Plant Physiol. 129, 229-242
- Miller, J.M., und Conn, E.E. (1980): Metabolism of hydrogen cyanid by higher plants.
Plant Physiol. 65, 1199-1202
- Mkpong, O.E., Chism, G. und Syre, R.T. (1990): Purification, characterization and localization of linamarase in Cassava.
Plant Physiol. 93, 176-181
- Mohr, H. und Schopfer, P. (1992): Pflanzenphysiologie, 18. Aufl. Springer Verlag
- Møller, B.L. und Seigler, D.S. (1998): Biosynthesis of cyanogenic glucosides, cyanolipids and related compounds. In: Plant amino acids: Biochemistry and biotechnology (ed. Liener, I.E.) Decker, New York, 563-609
- Murashige, T. und Skoog, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture.
Physiol. Plant 15, 473-497
- Nagakawa, N., Konagai, A., Fukui, H. und Tabata, M. (1984): Release and crystallization of berberine in the liquid medium of *Thalictrum minus* cell suspension cultures.
Plant Cell Report 3, 254-257
- Nahrstedt, A., Wray, V., Grotjahn, L., Fikenscher, L.H. und Hegnauer, R. (1983): New acylated cyanogenic diglycosides from fruits of *Anthemis cairica* and *A. altissima*.
Planta Med. 49, 143
- Nahrstedt, A. (1985): Cyanogenic compounds as protecting agents for organisms.
Plant Syst. Evol. 105, 35-47

- Nahrstedt, A., Sattar, E.A. und El-Zalabani, M.H. (1990): Amygdalin acyl derivatives, cyanogenic glycosides from the seeds of *Merrimia dissecta*. *Phytochemistry* 29 (4), 1179-1181
- Nahrstedt, A. (1992): The biology of the cyanogenic glycosides: New developments. In: *Proceedings of the Phytochemical Society of Europe*. (eds. Menge, K. und Pilbeam, D.J.) Clarendon Press, Oxford, 249-269
- Nahrstedt, A. (1996) : Relationship between the defense systems of plants and insects. In: *Phytochemical diversity and redundancy in ecological interactions*. (eds. Romeo, J.T., Saunders, J.A. und Barbosa, P., Plenum Press, New York, 217-230
- Nartey, F. (1969): Studies on Cassava, *Manihot utilissima*, II. Biosynthesis of aparagine-¹⁴C from ¹⁴C-labelled HCN and its relationship with cyanogenesis. *Physiol. Plant.* 22, 1085-1096
- Nartey, F. (1980): Cyanide in tropical feeds and foodstuffs. In: *Cyanide in biology* (eds. Vennesland, B. et al., ISBN 0-12-716980-6) 115-132
- Niedzwiedz-Siegien, I. (1997): Cyanogenic glucosides in *Linum usitatissimum*. *Phytochemistry* 49 (1), 59-63
- O'Brien, T.P. und Mc Cully, M.E. (1981): A tissue culture from Tapioka. *Plant Science Letters* 1, 237-241. Elsevier Science Publishing Company, Amsterdam.
- Oba, K., Conn, E.E., Canut, H. und Boudet, A.M. (1981): Subcellular localization of o-(β -D-glucosyloxy)cinnamic acid and of the β -glucosidase in leaves of *Melilotus alba*. *Pl. Physiol. Lancaster* 68, 1359-1363
- Paczkowski, C. und Wojciechowski, Z. (1988) : The occurrence of UDPG-dependent glucosyltransferase specific for sapogenin in *Asparagus officinalis*. *Phytochem.* 27 (9), 2743-2747
- Parr, A.J., Robins, R.J. und Rhodes, M.J.C. (1987) : Release of secondary products by plant-cell cultures. In: *Process possibilities in plant and animal cell culture*. (eds. Webb, C. und Mavituna, F.) Ellis Horwood, Chichester, 229-237
- Paulson, J. und Colley, K.J. (1989): Glycosyltransferases. *The Journ. Biol. Chem.* 264 (30), 17651-176718
- Petit, A., Berkaloff, A. und Tempe, J. (1986): Multiple transformation of plant cells by *Agrobacterium* may be responsible for the complex organisation of t-DNA in grown gall and hairy root. *Mol. Gen. Genet* 202 (3), 388-393

- Poulton, J.E. (1988): Localization and catabolism of cyanogenic glucosides. In: Cyanid compounds in biology. (eds. Evertt, D. and Harnett, S.) Wiley & Sons, ISBN 0-471-91904-7) 67-81
- Poulton, J.E. (1990): Cyanogenesis in plants.
Plant-Physiol. 94, 401-405
- Poulton, J.E. und Li, C.P. (1994): Tissue level compartmentation of (R)-amygdalin and amygdalin hydrolase prevents large-scale cyanogenesis in undamaged *Prunus* seeds.
Plant Physiol. 104, 29-35
- Preisser, J. und Komor, E. (1988): Analysis of the reaction products from incubation of sugarcane vacuoles with UDPG: no evidence for the group translocator.
Plant Physiol. 88, 259-265
- Proksch, P. (1991): Pflanzliche Sekundärstoffe als chemischer Fraßschutz gegen herbivore Insekten.
Pharmazie in unserer Zeit 20, 217-224
- Rataboul, P., Alibert, G., Boller, T. und Boudet, A.M. (1985): Intracellular transport and vacuolar accumulation of o-coumaric acid glucoside in *Melilotus alba* mesophyll cell protoplasts.
Biochemica et Biophysica Acta 816, 25-36
- Reay, P. und Conn, E.E. (1974): The purification and properties of a UDP-glucose-aldehyd cyanohydrin β -glucosyltransferase from *Sorghum* seedlings
J. Biol. Chem. 249 (18), 5826-5830
- Reinhold, L. und Kaplan, A. (1984): Membrane transport of sugars and aminoacids.
Annual Review of Plant Physiology 35, 45-83
- Renaudin, J.P. und Gern, J. (1982): Compartmentation mechanisms of indole alkaloids in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*.
Physiologie Végétale 20, 533-547
- Renaudin, J.P. (1989): Different mechanisms control the vacuolar compartmentation of ajmalicine in *Catharanthus roseus* cell cultures.
Plant Physiology and Biochemistry 27, 613-621
- Rissler, J.F. und Millar, R.L. (1977): Biochemical evidence for the histochemical localization of linamarase activity in *Lotus corniculatus* infected with *Stemphylium loti*.
Protoplasma 92, 57-70
- Robinson, M.E. (1930): Cyanogenesis in plants.
Biochemical Review of the University of Cambridge Philosophical Society 5, 126-141

- Rudat, A., Decker, W. und Göring, H. (1992): Einfluß von Gamma- und UV-Strahlung auf die biochemische Differenzierung (Betacyan-Bildung) in einer Zellkultur von *Chenopodium album*.
Zeitschrift der Humboldt-Universität, Berlin, R. Mathematik/Naturwiss. 41 (3)
- Sagasser, M. (1996): Änderung im Spektrum cyanogener Glucoside während der Samenentwicklung von Lein (*Linum usitatissimum*).
Diplomarbeit, Naturwissenschaftliche Fakultät, TU Braunschweig
- Sambrook, J. Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989): Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd Edition Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Saunders, J.A. und Conn, E.E (1977): Subcellular localization of the cyanogenic glucoside in *Sorghum* by autoradiography.
Plant Physiol. 59, 647-652
- Saunders, J.A., Conn, E.E., Lin, C.H. und Shimada, M. (1977): Localization of cinnamic acid 4-monooxygenase and the membrane-bound enzyme system for dhurrin biosynthesis in *Sorghum* seedlings.
Plant Physiol. 60, 629-634
- Saunders, J.A., Conn, E.E., Lin, C.H. und Stocking, C.R. (1977a): Subcellular localization of the cyanogenic glucoside of *Sorghum* by autoradiography
Plant Physiol. 59, 647-652
- Saunders, J.A. und Conn, E.E. (1978): Presence of the cyanogenic glucoside dhurrin in isolated vacuoles from *Sorghum*.
Plant Physiol. 61, 154-157
- Schaumann, A., Bruyant-Vannier, M.P., Goubet, F. und Morvan, C. (1993): Pectic metabolism in suspension-cultured cells of Flax, *Linum usitatissimum*.
Plant Cell Physiol. 34 (6), 891-897
- Schilcher, H. und Wilkens-Sauter, M. (1986): Quantitative Bestimmung cyanogener Glycoside in *Linum usitatissimum* mit Hilfe der HPLC.
Fette - Seifen - Anstrichmittel 88 (8), 287-290
- Schnackenwinkel, K. (1989): Die Variabilität der pflanzlichen Cyanogenese.
Hausarbeit zur 1. Staatsprüf. f. d. Lehramt an Gymnasien, Bot. Institut der TU Braunschweig
- Schomburg, G. (1987): Gaschromatographie-Grundlagen, Praxis, Kapilartechnik
2.Auflage, VCH, Weinheim
- Schwarzkopf, E. und Miersch, O. (1992): In vitro glucosylation of dihydrojasmonic acid and abscisic acid.
Biochem. Physiol. Pflanzen 188, 57-65
- Seigler, D.S. (1991): Cyanide and cyanogenic glycosides, in Herbivores: Their interaction with secondary plant metabolites, Vol I, The Chemical

- Participants (eds. Rosenthal, G.A. und Berenbaum, M.R.) Academic Press, San Diego, 35-77
- Selmar, D. (1986): Cyanogenese in Hevea: Zwei Wege zur Metabolisierung cyanogener Glycoside.
Dissertation, Naturwissenschaftliche Fakultät, TU Braunschweig
- Selmar, D., Lieberei, R., Biehl, B. und Voigt, J. (1987): Linamarase in Hevea, a nonspecific β -Glucosidase.
Plant Physiol. 83, 557-563
- Selmar, D., Lieberei, R. und Biehl, B. (1988): Mobilization and utilization of cyanogenic glycosides: the linustatin-pathway.
Plant Physiol. 86, 711-716
- Selmar, D. (1992): Die Mobilisierung cyanogener Verbindungen.
Habilitationsschrift, Naturwissenschaftliche Fakultät, TU Braunschweig
- Selmar, D. (1993a): Apoplastic occurrence of cyanogenic β -glucosidases and consequences for the metabolism of cyanogenic glucosides. In: The biochemistry and molecular biology of β -glucosidases (ed. Esen, A.) American Chemical Society, Washington, 191-204
- Selmar, D. (1993b): Transport of cyanogenic glucosides: linustatin uptake by *Hevea* cotyledons.
Planta 191, 191-199
- Selmar, D. (2000): Biosynthesis of cyanogenic glucosides, glucosinotates and nonprotein amino acids. In: Biochemistry of plant secondary metabolism, Annual plant reviews, Vol 2 (ed. Wink, M.) Sheffield Academic Press-CRC Press, 79-150
- Sibbensen, O., Koch, B., Halkier, B.A. and Moller, B.L. (1994): Isolation of the heme-thiolate enzyme cytochrome P-450-TYR, which catalyzes the committed step in the biosynthesis of the cyanogenic glucoside, dhurrin, in *Sorghum bicolor* (L.) Moench.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 9740-9744
- Sibbensen, O., Koch, B., Halkier, B.A. and Moller, B.L. (1995): Cytochrome P-450-TYR is a multifunctional heme-thiolate enzyme catalyzing the conversion of L-tyrosin to p-hydroxy-phenylacetaldehyde oxime in the biosynthesis of the cyanogenic glucoside, dhurrin, in *Sorghum bicolor* (L.) Moench.
J. Biol. Chem. 270, 3506-3511
- Siegel, L.M. (1965): A direct microdetermination for sulphide.
Analyt. Biochem. 11, 126-132
- Smith, C.R., Weisleder, D. und Miller, R.W. (1980): Linustatin and neolinustatin: cyanogenic glycosides of linseed meal that protect animals against selenium toxicity.
J. Org. Chem. 45, 507-510

- Sörbo, B.H. (1953): Crystalline Rhodanase: Purification and physicochemical examination.
Acta Chem. Scand. 7, 1129-1136
- Stafford, H.A. (1969): Changes in phenolic compounds content and related enzymes in young plants of *Sorghum*.
Phytochemistry 8, 743-752
- Stein, W.D. (1986): Transport and diffusion across cell membranes.
Academic Press, Orlando
- Street, H.E. (1977): Plant tissue and cell cultures.
Botanical Monographs. Vol. 11.
- Suzuki, M., Nagakawa, K., Fukui, H. und Tabata, M. (1987): Relationship of berberine-producing capability between *Thalictrum flavum* and *T. dipterocarpum*.
Plant Cell Reports 7, 26-29
- Suzuki, M., Nagakawa, K., Fukui, H. und Tabata, M. (1988): Alkaloid production in cell suspension culture of *Thalictrum flavum* and *T. dipterocarpum*.
Annual Review of Plant Physiology 36, 175-208
- Swain, E. und Poulton, J.E. (1994): Immunocytochemical localization of prunasin hydrolase and mandelonitrile lyase in stems and leaves of *Prunus serotina*.
Plant Physiol. 106, 1285-1291
- Thayer, S.S. und Conn, E.E. (1981): Subcellular localization of dhurrin β -glucosidase and hydroxynitrile-lyase in the mesophyll cells of *Sorghum* leaf blades.
Plant Physiol. 67, 617-622
- Umbach, H. (1989): β -Cyanoalaninsynthase in *Hevea* Species.
Diplomarbeit, Naturwissenschaftliche Fakultät, TU Braunschweig
- Vazart, J. (1968): Organisation et ultrastructure du sac embryonnaire du Lin (*Linum usitatissimum* L.).
Rep. Cytol. et Biol. veg. 32, 27-240
- Wagner, G.J. (1987): Isolation of mature vacuoles of higher plants: general principles, criteria for purity and integrity
Methodes in Enzymology 148, 55-73
- Warnecke, D. (1991): Versuche zur Reinigung der UDP-Glucose:Sterol- β -Glucosyltransferase.
Diplomarbeit, Botanisches Institut, Hamburg
- Warnecke, A. (1995): Linustatin spaltende Diglucosidasen in Maniok (*Manihot esculenta* Crantz).
Diplomarbeit, Naturwissenschaftliche Fakultät, TU Braunschweig

- Watkins, W. (1986): Glycosyltransferases. Early history, development and future prospects.
Carbohydr. Res. 149, 1-12
- Wellmann, E. (1971): Phytochrom mediated flavone glycoside synthesis in cell suspension cultures of *Petroselinum hortense* after preirradiation with ultraviolet light.
Planta 101, 283-286
- Werner, C. und Matile, P. (1985): Accumulation of coumarylglucosides in vacuoles of barley mesophyll protoplasts.
J. Plant Physiol. 118, 237-249
- Widhol, J.M. (1972): The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells.
Stain Technol. 47, 189-194
- Wiermann, R. (1981): Secondary plant products and cell and tissue differentiation. In: The biochemistry of plants. Vol. 7, Secondary plant products (eds. Conn, E.E. et al.), Academic Press
- Wilson, S.B., King, P.J. und Street, H.E. (1971): Studies on the growth in culture of plant cells. XII. A versatile system for the large scale batch or continuous culture of plant cell suspensions.
J. Exp. Bot. 21, 177-207
- Wurtele, E.S., Thayer, S.S. und Conn, E.E. (1982): Subcellular localization of UDP-glucose:aldehyde cyanohydrin β -glucosyltransferase in epidermal plastids of *sorghum* leaf blades.
Plant Physiol. 70, 127-132
- Yamaha, T. und Cardini, C. (1960): The biosynthesis of plant glycosides. I. Monoglucosides.
Arch. Biochem. Biophys. 86, 127-132
- Yamamoto, H., Suzuki, M., Suga, Y., Fukui, H. und Tabata, M. (1987): Participation of an active transport system in berberine-secreting cultured cells of *Thalictrum minus*.
Plant Cell Reports 6, 356-359

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Reaktionsschema der pflanzlichen Cyanogenese (CONN, 1980)

Abbildung 2: Fixierungsmechanismus für Blausäure über die β -Cyanoalanin-synthase und die β -Cyanoalaninhydrolase

Abbildung 3: Verlagerung und Metabolisierung cyanogener Glycoside in *Hevea brasiliensis*

Abbildung 4: Anatomischer Bau eines Leinsamen

- a) Schnitt durch einen 12 Tage alten Leinsamen, Vergr. 10 fach
- b) schematischer Längsschnitt durch den sek. Embryosack eines Leinsamen (entnommen aus Vazart, 1968),

Abbildung 5: Chromatogramm des über HPLC fraktionierten Inkubationsansatzes mit szintillationsspektroskopischen Daten der gesammelten Fraktionen

Die Inkubation eines 12 Tage alten Leinsamen mit ^{14}C -Fruktose-1,6-bisphosphat (0,53 μCi) und Aldolase (0,25 U) erfolgte bei 30 °C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre. Nach Ablauf der 12-stündigen Inkubationszeit wurde der Leinsame in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die cyanogenen Glycoside wurden methanolisch extrahiert (Kapitel 2.1.3.2), über HPLC aufgetrennt und mit Hilfe des Brechungsindex quantifiziert (Kapitel 2.1.5). Das Eluat zur Retentionszeit der cyanogenen Glycoside wurde fraktioniert aufgefangen, anschließend eingengt und erneut über die HPLC chromatographiert. Die nach der 2. Chromatographie vorliegenden Fraktionen wurden einer Szintillationsspektroskopie unterzogen (Kapitel 2.1.4). Die Menge an Radioaktivität, die in den HPLC-Fractionen vorlag, sowie die um das Grundrauschen korrigierte Radioaktivität, ist unter dem Chromatogramm in cpm aufgeführt. Das Grundrauschen wurde als Radioaktivität ermittelt, die während der ersten Minuten eluierte, solange der Brechungsindex keine Substanz signalisierte. Dieser Wert wurde mit der jeweiligen Fraktionsgröße multipliziert. Dargestellt sind die Meßwerte aus einer von fünf parallelen Inkubationen eines Samens mit ^{14}C -Fruktose-1,6-bisphosphat.

Abbildung 6: Radioaktivität der HPLC Fraktionen in Abhängigkeit von der Retentionszeit

Die cyanogenen Glycoside wurden methanolisch extrahiert und anschließend über HPLC aufgetrennt (Kapitel 2.1.3.2 und 2.1.5). Die nach der Chromatographie vorliegenden Fraktionen wurden einer Szintillationsspektroskopie unterzogen (Kapitel 2.1.4). Der Gehalt der cyanogenen Glycoside wurde über die Peakfläche in Relation zur Peakfläche eines definierten Standards bestimmt. Dargestellt sind die Meßwerte aus einer von fünf parallelen Inkubationen eines Samens mit ^{14}C -Fruktose-1,6-bisphosphat.

Abbildung 7: Chromatogramm des enzymatisch hydrolysierten Linustatins mit szintillationsspektroskopischen Daten der gesammelten HPLC - Fraktionen

Das radioaktiv markierte Linustatin aus dem inkubierten Samen wurde mit einer sequentiellen Diglucosidase wie in Kapitel 2.1.3.3.2 beschrieben inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Ansatz in flüssigem Stickstoff schockgefroren und lyophilisiert (Kapitel 2.1.3.2). Die cyanogenen Glycoside wurden aus dem Lyophilisat methanolisch extrahiert und anschließend über HPLC aufgetrennt (Kapitel 2.1.5). Die nach der Chromatographie vorliegenden Fraktionen wurden einer Szintillationsspektroskopie unterzogen (Kapitel 2.1.4). Die Menge an Radioaktivität, die in den HPLC-Fractionen vorlag, ist unter dem Chromatogramm in cpm aufgeführt.

Abbildung 8: Stationen der Kalluskultivierung von *Linum usitatissimum*

Zur Induktion des Kallus wurden sterile Sprossabschnitte von Leinpflanzen verwendet, die auf vier verschiedene Medien ausgelegt wurden, die Subkultur des Kallus erfolgte auf Petrischalen mit verfestigtem Medium entsprechender Zusammensetzung. Die detaillierte Zusammensetzung der Medien und die genaue Durchführung sind in den Kapiteln 2.2.2 und 2.2.3 dargestellt.

- (1): der Kallus zeigte ein mittelschnelles Wachstum, seine Struktur war sehr wässrig, seine Farbe war gelblich-weiß; die Linie wurde eingestellt.
- (2): dieser Kallus zeigte ein langsames Wachstum und hatte eine wässrige Struktur; auch diese Linie wurde eingestellt.
- (3): das Kallusgewebe war gelb-braun gefärbt, hatte eine sehr feste Struktur und zeigte ein schnelles Wachstum
- (4): der Kallus hatte eine weiß-gelbe Farbe und eine schnittfeste Struktur und zeigte ein schnelles Wachstum; er wurde zum Anlegen einer Zellsuspensionskultur verwendet.

Abbildung 9: Zellsuspensionskultur von *L. usitatissimum* aus Kallus

Die abgebildete Suspension befindet sich in Phase drei der Etablierung, 6 Monate nach der Inokulation des Kallus in L 4.3-Flüssigmedium. Die Größe der Aggregate variiert nur noch sehr wenig. Die Suspension wurde vier Tage zuvor passagiert.

Abbildung 10: Wurzelflüssigkultur von *L. usitatissimum*

Die abgebildete Flüssigkultur wurde 6 Monate in MS-Basalmedium (Tabelle 1) kultiviert. Eine Passage erfolgte im Abstand von 21 Tagen, die letzte Passage erfolgte 16 Tage zuvor.

Abbildung 11: Wurzelflüssigkultur von *L. atalane*

Die abgebildete Flüssigkultur wurde 6 Monate in B5-Basalmedium nach Gamborg (Tabelle 2) kultiviert. Eine Passage wurde im Abstand von 21 Tagen durchgeführt, die letzte Passage erfolgte 10 Tage zuvor.

Abbildung: 12 Frisch- und Trockengewicht der Zellsuspensionskultur in Abhängigkeit von der Kulturdauer

Dargestellt sind die Mittelwerte zweier Wachstumszyklen mit jeweils drei parallelen Bestimmungen. Die Kultivierung der Zellen und die Durchführung der Bestimmungen von Frisch- und Trockengewicht sind in Kapitel 2.2.7.1, 2.2.7.2 und 2.2.7.3 aufgeführt.

Abbildung 13: Leitfähigkeit des Kulturmediums der Zellsuspension in Abhängigkeit von der Kulturdauer

Dargestellt sind die Mittelwerte zweier Wachstumszyklen mit jeweils drei parallelen Bestimmungen. Die Kultivierung der Zellen und die Durchführung der Leitfähigkeitsbestimmung ist in Kapitel 2.2.7.1 und 2.2.7.5 dargestellt.

Abbildung 14: Saccharosekonzentration des Kulturmediums der Zellsuspension in Abhängigkeit von der Kulturdauer

Dargestellt sind die Mittelwerte zweier Wachstumszyklen mit jeweils drei parallelen Bestimmungen. Die Kultivierung der Zellen und die Durchführung zur Bestimmung der Saccharosekonzentration ist in Kapitel 2.2.7.1 und 2.2.7.6 erläutert.

Abbildung 15: Änderung des pH-Wertes der Zellsuspension während des Wachstumszyklus

Dargestellt sind die Mittelwerte zweier Wachstumszyklen mit jeweils drei parallelen Bestimmungen. Die Kultivierung der Zellen und die Durchführung der pH-Wert Messung ist in Kapitel 2.2.7.1 und 2.2.7.4 beschrieben.

Abbildung 16: Frisch- und Trockengewicht der Wurzelflüssigkultur in Abhängigkeit von der Kulturdauer

Dargestellt sind die Mittelwerte dreier Wachstumszyklen mit jeweils drei parallelen Bestimmungen. Die Kultivierung der Wurzeln und die Durchführung der Bestimmungen von Frisch- und Trockengewicht sind in Kapitel 2.2.7.1 und 2.2.7.2 dargestellt.

Abbildung 17: Leitfähigkeit des Kulturmediums der Wurzelflüssigkultur in Abhängigkeit von der Kulturdauer

Dargestellt sind die Mittelwerte dreier Wachstumszyklen mit jeweils drei parallelen Bestimmungen. Die Kultivierung der Wurzeln und die Bestimmung der Leitfähigkeit sind in Kapitel 2.2.7.1 und 2.2.7.5 beschrieben.

Abbildung 18: Saccharosekonzentration des Kulturmediums der Wurzelflüssigkultur in Abhängigkeit von der Kulturdauer

Dargestellt sind die Mittelwerte dreier Wachstumszyklen mit jeweils drei parallelen Bestimmungen. Die Kultivierung der Wurzeln und die Bestimmungen der Saccharosekonzentration sind in Kapitel 2.2.7.1 und 2.2.7.6 beschrieben.

Abbildung 19: Änderung des pH-Wertes im Verlauf des Wachstumszyklus der Wurzelflüssigkultur

Dargestellt sind die Mittelwerte dreier Wachstumszyklen mit jeweils drei parallelen Bestimmungen. Die Kultivierung der Wurzeln und die Durchführung der Bestimmungen von Frisch- und Trockengewicht sind in Kapitel 2.2.7.1 und 2.2.7.2 beschrieben.

Abbildung 20: Blausäurepotenzial in den Organen von Leinpflanzen

Dargestellt ist die Summe der cyanogenen Verbindungen, die enzymatisch als Blausäurepotenzial bestimmt wurden. Die cyanogenen Glucoside wurden methanolisch aus den Organen extrahiert, bis zur Trockne eingedampft, anschließend in Mc Ilvaine-Puffer pH 5,6 resuspendiert und nach enzymatischer Spaltung mit Hilfe des Cyanidtestes quantifiziert (siehe Kapitel 2.2.7.9). Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von fünf getrennten Bestimmungen.

Abbildung 21: Blausäurepotenzial in verschiedenen Zell- und Wurzelkulturen unterschiedlicher Leinvarietäten

Dargestellt ist die Summe der cyanogenen Verbindungen, die enzymatisch als Blausäurepotenzial bestimmt wurden (siehe Kapitel 2.2.7.9).

Die Zellkulturen *L. nodiflorum*, *L. album* X4, *L. mucronatum* und *L. album* 3-8-2 wurden als gefriegetrocknetes Zellmaterial von Herrn Prof. Alfermann (Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellt. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von fünf getrennten Bestimmungen.

Abbildung 22: Blausäurepotenzial und Frischgewicht der Zellsuspensionskultur in Abhängigkeit der Kulturdauer

Dargestellt ist die Summe der cyanogenen Verbindungen, die enzymatisch als Blausäurepotenzial bestimmt wurden (siehe Kapitel 2.2.7.9). Die Kultivierung der Zellen und die Durchführung der Bestimmung des Frischgewichtes sind in Kapitel 2.2.7.1 und 2.2.7.2 aufgeführt. Abgebildet sind die Mittelwerte zweier Wachstumszyklen mit jeweils drei parallelen Bestimmungen.

Abbildung 23: Blausäurepotenzial und Frischgewicht der Wurzelflüssigkultur in Abhängigkeit der Kulturdauer

Dargestellt ist die Summe der cyanogenen Verbindungen, die enzymatisch als Blausäurepotenzial bestimmt wurden (siehe Kapitel 2.2.7.9). Abgebildet sind die Mittelwerte dreier Wachstumszyklen mit jeweils drei parallelen Bestimmungen.

Abbildung 24: Kalibriergerade für die gaschromatographische Bestimmung cyanogener Glycoside

Proben definierter Gehalte der Standardsubstanzen wurden gemäß Kapitel 2.2.7.9.2 derivatisiert und über die Gaschromatographie analysiert.

Abbildung 25: Gehalt cyanogener Glycoside in Zellsuspensionen von *Linum usitatissimum* in Abhängigkeit von der Kulturdauer

Für die Bestimmung der cyanogener Glucoside wurden die gefriergetrockneten Proben methanolisch extrahiert, anschließend derivatisiert und gaschromatographisch analysiert (siehe Kapitel 2.2.7.9). Die Kultivierung der Zellen und die Durchführung der Bestimmung des Frischgewichtes sind in Kapitel 2.2.7.1 und 2.2.7.2 aufgeführt. Abgebildet sind die Mittelwerte dreier Wachstumszyklen mit jeweils drei parallelen Bestimmungen.

Abbildung 26: Gehalt cyanogener Glycoside in 12 Tage alten Wurzelflüssigkulturen

Für die Bestimmung der cyanogener Glucoside wurden die gefriergetrockneten Proben methanolisch extrahiert, anschließend derivatisiert und gaschromatographisch analysiert (siehe Kapitel 2.2.7.9). Die Kultivierung der Wurzeln und die Durchführung der Bestimmung des Frischgewichtes sind in Kapitel 2.2.7.1 und 2.2.7.2 aufgeführt. Dargestellt ist der Mittelwert von fünf getrennten Bestimmungen.

Abbildung 27: Linamaraseaktivität in Pflanzenorganen von *Linum usitatissimum*

Die Linamaraseaktivität wurde mit Linamarin als Substrat im Thunberg-Gefäß bestimmt. Für den Niedersalzextrakt wurde ein Gesamtextrakt mit Citrat-Phosphat-Puffer (40 mmol/L, pH 5,6; 2 mmol/L Na-Ascorbat) hergestellt. Für den Hochsalzextrakt wurde der mehrfach nachextrahierte, unlösliche Homogenisationsrückstand des Gesamtextraktes mit 1 M NaCl-Lösung behandelt (siehe Kapitel 2.2.8.2). Dargestellt sind die Mittelwerte aus den Bestimmungen für drei verschiedenen Pflanzen.

Abbildung 28: Linamaraseaktivität in Zellen und Medium der Zellsuspensionskultur von *Linum usitatissimum*

Die Linamaraseaktivität wurde mit Linamarin als Substrat im Thunberg-Gefäß bestimmt. Der Niedersalzextrakt (NS) wurde als Gesamtextrakt mit Citrat-Phosphat-Puffer (40 mmol/L, pH 5,6; 2 mmol/L Na-Ascorbat) hergestellt. Für den Hochsalzextrakt (HS) wurde der mehrfach nachextrahierte unlösliche Homogenisationsrückstand des Gesamtextraktes mit 1 M NaCl-Lösung behandelt (siehe Kapitel 2.2.8.2). Die Konzentrierung des Enzyms aus dem Medium erfolgte in einem Centriprep-Konzentrator (Centriprep 3, Trenngrenze 3.000 D, Amicon). Dargestellt sind die Mittelwerte der Bestimmungen aus drei verschiedenen Kulturkolben nach einer Kulturdauer von 14 Tagen. NS: Niedersalzextrakt; HS: Hochsalzextrakt; KT: Kulturtag

Abbildung 29: Linamaraseaktivität in Wurzeln und Medium der Wurzelflüssigkulturen von *Linum usitatissimum*

Die Linamaraseaktivität wurde mit Linamarin als Substrat im Thunberg-Gefäß bestimmt. Der Niedersalzextrakt (NS) wurde als Gesamtextrakt mit Citrat-Phosphat-Puffer (40 mmol/L, pH 5,6; 2 mmol/L Na-Ascorbat) hergestellt. Für den Hochsalzextrakt (HS) wurde der mehrfach nachextrahierte, unlösliche Homogenisationsrückstand des Gesamtextraktes mit 1 M NaCl-Lösung behandelt (siehe Kapitel 2.2.8.4). Die Konzentrierung des Enzyms aus dem Medium erfolgte in einem Centriprep-Konzentrator (Centriprep 3, Trenngrenze 3.000 D, Amicon). Dargestellt sind die Mittelwerte der Bestimmungen aus drei verschiedenen Kulturkolben nach einer Kulturdauer von 14 Tagen. NS: Niedersalzextrakt; HS: Hochsalzextrakt; KT: Kulturtag

Abbildung 30: Linustatinaseaktivität in Pflanzenorganen von *Linum usitatissimum*

Die Linustatinaseaktivität wurde mit Linustatin als Substrat im Thunberg-Gefäß bestimmt. Der Niedersalzextrakt wurde als Gesamtextrakt mit Citrat-Phosphat-Puffer (40 mmol/L, pH 5,6; 2 mmol/L Na-Ascorbat) hergestellt. Für den Hochsalzextrakt wurde der mehrfach nachextrahierte, unlösliche Homogenisationsrückstand des Gesamtextraktes mit 1 M NaCl-Lösung behandelt (siehe Kapitel 2.2.8.3). Dargestellt sind die Mittelwerte aus den Bestimmungen für drei verschiedene Pflanzen.

Abbildung 31: Linustatinaseaktivität in Zellen und Medium der Zellsuspensionskultur von *Linum usitatissimum*

Die Linustatinaseaktivität wurde mit Linustatin als Substrat im Thunberg-Gefäß bestimmt. Der Niedersalzextrakt (NS) wurde als Gesamtextrakt mit Citrat-Phosphat-Puffer (40 mmol/L, pH 5,6; 2 mmol/L Na-Ascorbat) hergestellt. Für den Hochsalzextrakt (HS) wurde der mehrfach nachextrahierte, unlösliche Homogenisationsrückstand des Gesamtextraktes mit 1 M NaCl-Lösung behandelt (siehe Kapitel 2.2.8.3). Die Konzentrierung des Enzyms aus dem Medium erfolgte in einem Centriprep-Konzentrator (Centriprep 3, Trenngrenze 3.000 D, Amicon). Dargestellt sind die Mittelwerte der Bestimmungen aus drei verschiedenen Kulturkolben nach einer Kulturdauer von 14 Tagen.

NS: Niedersalzextrakt; HS: Hochsalzextrakt; KT: Kulturtage

Abbildung 32: Linustatinaseaktivität in Wurzeln und Medium der Flüssigkulturen von *Linum usitatissimum*

Die Linustatinaseaktivität wurde mit Linustatin als Substrat im Thunberg-Gefäß bestimmt. Der Niedersalzextrakt (NS) wurde als Gesamtextrakt mit Citrat-Phosphat-Puffer (40 mmol/L, pH 5,6; 2 mmol/L Na-Ascorbat) hergestellt. Für den Hochsalzextrakt (HS) wurde der mehrfach nachextrahierte, unlösliche Homogenisationsrückstand des Gesamtextraktes mit 1 M NaCl-Lösung behandelt (siehe Kapitel 2.2.8.3). Die Konzentrierung des Enzyms aus dem Medium erfolgte in einem Centriprep-Konzentrator (Centriprep 3, Trenngrenze 3.000 D, Amicon). Dargestellt sind die Mittelwerte der Bestimmungen aus drei verschiedenen Kulturkolben nach einer Kulturdauer von 14 Tagen.

NS: Niedersalzextrakt; HS: Hochsalzextrakt; KT: Kulturtage

Abbildung 33: β -Cyanoalinsynthaseaktivität in Wurzeln, Blättern und Sprossen von Leinpflanzen

Die β -Cyanoalinsynthaseaktivität wurde nach einer Methode von Blumenthal (1963) bestimmt. Das Enzym wurde mit einem TRIS/HCl-Puffer (0,2 M; pH 8,2; 2 mmol/L Na-Ascorbat) extrahiert (siehe Kapitel 2.2.8.3). Dargestellt sind die Mittelwerte aus den Bestimmungen für drei verschiedene Pflanzen.

Abbildung 34: β -Cyanoalinsynthaseaktivität in Wurzelflüssigkulturen, Zellkulturen von *Linum usitatissimum* und deren Medien

Die β -Cyanoalinsynthaseaktivität wurde nach einer Methode von Blumenthal (1963) bestimmt. Das Enzym wurde mit einem TRIS/HCl-Puffer (0,2 M; pH 8,2; 2 mmol/L Na-Ascorbat) extrahiert (siehe Kapitel 2.2.8.3). Die Konzentrierung des Enzyms aus dem Medium erfolgte in einem Centriprep-Konzentrator (Centriprep 3, Trenngrenze 3.000 D, Amicon). Dargestellt sind die Mittelwerte aus den Bestimmungen für drei verschiedene Kulturkolben.

KT: Kulturtage

Abbildung 35: Gehalt cyanogener Glucoside im Medium von Zellsuspensionskulturen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Die Inkubation der Zellsuspensionen erfolgte unter Standardbedingungen mit zugesetzter Natronlaugevorlage (siehe Kapitel 2.2.9.1). Zu Beginn der Inkubation wurden dem Medium 200 $\mu\text{mol/L}$ Linustatin zugesetzt. Das Medium wurde schockgefroren, und wie in Kapitel 2.7.8.1 beschrieben methanolisch extrahiert. Die Analyse der cyanogenen Glucoside erfolgte über ein HPLC-System mit RP-18 Säule (siehe Kapitel 2.2.9).

Abbildung 36: Gehalt aufgenommener cyanogener Glucoside in Zellsuspensionskulturen und deren Medium in Abhängigkeit der applizierten Linustatinkonzentration

Die Inkubation der Zellsuspensionen erfolgte unter Standardbedingungen mit zugesetzter Natronlaugevorlage (siehe Kapitel 2.2.9.1). Zu Beginn der Inkubation wurden dem Medium zwischen 0 - 200 $\mu\text{mol/L}$ Linustatin zugesetzt. Die Zellen und das Medium wurden nach 16 Stunden Inkubation schockgefroren, und wie in Kapitel 2.2.7.8.1 methanolisch extrahiert. Die Analyse der cyanogenen Glucoside erfolgte über ein HPLC-System mit RP-18 Säule (siehe Kapitel 2.2.9.3.). Linustatin wurde in den Zellen und dem Medium nicht nachgewiesen und ist daher nicht in der Abbildung dargestellt. Der für 0 $\mu\text{mol/L}$ dargestellte Wert stammt aus Abbildung 25.

Abbildung 37: Summe cyanogener Glucoside aus Medium und Zellen in Abhängigkeit von der applizierten Linustatinkonzentration

Die Inkubation der Zellsuspensionskulturen erfolgte unter Standardbedingungen mit zugesetzter Natronlaugevorlage (siehe Kapitel 2.2.9.1). Die dargestellten Daten wurden aus den Werten der Abbildung 36 kombiniert.

Abbildung 38: Gehalt aufgenommener cyanogener Glucoside in Zellsuspensionskulturen und deren Medium in Abhängigkeit vom pH-Wert des Mediums

Die Inkubation der Zellsuspensionen erfolgte unter Standardbedingungen mit zugesetzter Natronlaugevorlage (siehe Kapitel 2.2.9.1).

*) Zu Beginn der Inkubation wurden dem Medium 200 $\mu\text{mol/L}$ Linustatin zugesetzt.

Der pH-Wert der Medien wurde nach dem Autoklavieren auf Werte zwischen 4,5 und 7 eingestellt. Die Zellen und das Medium wurden nach 16 Stunden Inkubation schockgefroren, und wie in Kapitel 2.2.7.8.1 methanolisch extrahiert. Die Analyse der cyanogenen Glucoside erfolgte über ein HPLC-System mit RP-18 Säule (siehe Kapitel 2.2.9.3). Linustatin wurde in den Zellen und dem Medium nicht nachgewiesen und ist daher nicht in der Abbildung dargestellt.

Abbildung 39: Gehalt aufgenommener cyanogener Glucoside in Zellsuspensionskulturen und deren Medium beeinflusst durch weitere Glucoside im Medium

Die Inkubation der Zellsuspensionen erfolgte unter Standardbedingungen mit zugesetzter Natronlaugevorlage (siehe Kapitel 2.2.9.1).

*) Zu Beginn der Inkubation wurden dem Medium neben 200 $\mu\text{mol/L}$ Linustatin weitere Glucoside in einer Konzentration von 200 $\mu\text{mol/L}$ zugefügt.

Die Zellen und das Medium wurden nach 16 Stunden Inkubation schockgefroren, und wie in Kapitel 2.2.7.8.1 methanolisch extrahiert. Die Analyse der cyanogenen Glucoside erfolgte über ein HPLC-System mit RP-18 Säule (siehe Kapitel 2.2.9.3). Linustatin wurde in den Zellen und dem Medium nicht nachgewiesen und ist daher nicht in der Abbildung dargestellt.

Abbildung 40: Gehalt cyanogener Glucoside im Medium von Wurzelflüssigkulturen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer

Die Inkubation der Wurzelflüssigkulturen erfolgte unter Standardbedingungen mit zugesetzter Natronlaugevorlage (siehe Kapitel 2.2.9.1). Zu Beginn der Inkubation wurden dem Medium 200 $\mu\text{mol/L}$ Linustatin zugesetzt. Das Medium wurde schockgefroren und wie in Kapitel 2.2.7.8.1 beschrieben methanolisch extrahiert. Die Analyse der cyanogenen Glucoside erfolgte über ein HPLC-System mit einer RP-18 Säule (siehe Kapitel 2.2.9.3).

Abbildung 41: Summe cyanogener Glucoside aus Medium und Wurzeln in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer

Die Inkubation der Wurzelflüssigkulturen erfolgte unter Standardbedingungen mit zugesetzter Natronlaugevorlage (siehe Kapitel 2.2.9.1). Die dargestellten Daten wurden aus den Werten der Abbildung 40 und Tabelle 13 kombiniert.

Abbildung 42: Gehalt aufgenommener cyanogener Glucoside in Wurzeln und Medium der Flüssigkulturen in Abhängigkeit von der applizierten Linustatinkonzentration

Die Inkubation der Wurzelflüssigkulturen erfolgte unter Standardbedingungen mit zugesetzter Natronlaugevorlage (siehe Kapitel 2.2.9.1). Zu Beginn der Inkubation wurden dem Medium 0 - 200 $\mu\text{mol/L}$ Linustatin zugesetzt. Die Wurzeln und das Medium wurden nach 22 Stunden Inkubation schockgefroren, und wie in Kapitel 2.2.7.8.1 beschrieben methanolisch extrahiert. Die Analyse der cyanogenen Glucoside erfolgte über ein HPLC-System mit einer RP-18 Säule (siehe Kapitel 2.2.9). Linustatin wurde in den Wurzeln nicht detektiert und ist in der Abbildung nicht dargestellt. Der Wert für 0 $\mu\text{mol/L}$ appliziertes Linustatin wurde gaschromatographisch bestimmt.

Abbildung 43: Summe cyanogener Glucoside aus Medium und Wurzeln in Abhängigkeit von der Linustatinkonzentration

Die Inkubation der Wurzelflüssigkulturen erfolgte unter Standardbedingungen mit zugesetzter Natronlaugevorlage (siehe Kapitel 2.2.9.1). Die dargestellten Daten wurden aus den Werten der Abbildung 42 kombiniert.

Abbildung 44: Gehalt aufgenommener cyanogener Glucoside in Wurzelflüssigkulturen und deren Medium in Abhängigkeit vom pH-Wert des Mediums

Die Inkubation der Wurzelflüssigkulturen erfolgte unter Standardbedingungen mit zugesetzter Natronlaugevorlage (siehe Kapitel 2.2.9.1). Zu Beginn der Inkubation wurden dem Medium 200 $\mu\text{mol/L}$ Linustatin zugesetzt. Der pH-Wert der Medien wurde nach dem Autoklavieren auf Werte zwischen 4 und 7 eingestellt. Die Wurzeln und das Medium wurden nach 22 Stunden Inkubation schockgefroren und methanolisch extrahiert (Kapitel 2.2.7.8.1). Die Analyse der cyanogenen Glucoside erfolgte über ein HPLC-System mit einer RP-18 Säule (siehe Kapitel 2.2.9). Linustatin wurde in den Wurzeln nicht detektiert und ist daher nicht dargestellt.

Abbildung 45: Summe der cyanogenen Glucoside in Medium und Wurzeln von Wurzelflüssigkulturen bei unterschiedlichen pH-Werten

Die Inkubation der Wurzelflüssigkulturen erfolgte unter Standardbedingungen mit zugesetzter Natronlaugevorlage (siehe Kapitel 2.2.9.1). Die dargestellten Daten wurden aus den Werten der Abbildung 44 kombiniert.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung des MS-Basalmediums

Dieses Medium wurde für die Kallus- und Zellsuspensionskultur von *Linum usitatissimum* und für die Anzucht von sterilen Leinpflanzen eingesetzt.

Tabelle 2: Zusammensetzung des B5-Basalmediums

Dieses Medium wurde für die Kultur von transformierten Wurzeln von *Linum atalante* in Flüssigkultur und auf Petrischalen eingesetzt.

Tabelle 3: Zusammensetzung des MS-Basalmediums mit reduzierten Stickstoffgehalt für Kultivierung in Flüssigkultur (1/2MS_S)

Dieses Medium wurde für Wurzelkulturen von *Linum usitatissimum* in Flüssigkultur eingesetzt.

Tabelle 4: Zusammensetzung des MS-Basalmediums mit reduzierten Stickstoffgehalt für Kultivierung auf Petrischalen (1/2MS_P)

Dieses Medium wurde für Wurzelkulturen von *Linum usitatissimum* auf Petrischalen eingesetzt.

Tabelle 5: Übersicht über die zur Kallusinduktion verwendeten Medien

- 1) nach SCHAUMANN et. al., 1993: Die Konzentrationen an Mikronährelementen, organischen Bestandteilen und Vitaminen entsprechen dem MS Basalmedium (Tabelle 1), die Konzentrationen an Makronährelementen ist um die Hälfte reduziert und es wurde 4 µM Casein zugesetzt.
- 2) Die Konzentrationen an Mikronährelementen, organischen Bestandteilen und Vitaminen entsprechen dem L1, es wurde kein Casein zugesetzt.
- 3) MS-Basalmedium mit reduzierten Stickstoffgehalt (1/2MS_S, siehe Tabelle 3).
- 4) MS Basalmedium (Tabelle 1)

Tabelle 6: Medien zur weiteren Kultur des erfolgreich induzierten Kallus

- 1) MS-Basalmedium mit reduziertem Stickstoffgehalt (1/2MS_S siehe Tabelle 3)
- 2) MS Basalmedium (siehe Tabelle 1)

Tabelle 7: Medien zur Induktion und Stammhaltung von Kallus aus *Linum usitatissimum*

Der Kallus wurde auf mit Agar verfestigten Medien in Petrischalen induziert und subkultiviert, detaillierte Medienrezepturen sind in Kapitel 2.2.2 dargestellt.

Tabelle 8: Gehalte cyanogener Glycoside in einer Probe aus Blättern und in einer Additionsanalyse

Der methanolische Extrakt eines Leinblattes wurde zur Trockne eingedampft, in Mc Ilvaine-Puffer resuspendiert. Wie in Kapitel 2.2.7.8 beschrieben, wurde der Gehalt cyanogener Glucoside bestimmt. Ein Aliquot dieses Extraktes wurde mit 1 µmol Linamarin und 1 µmol Linustatin versetzt und erneut wurde der Gehalt cyanogener Glucoside nach den Standardverfahren bestimmt. Eingesetzt wurden 100 µL Enzymgemisch aus β-Glucosidase und Emulsin (s. Kapitel 2.2.7.9.2)

Tabelle 9: Aktivität der NADH:Malatdehydrogenase in Zellen und Medium der Zellsuspensionskulturen aus *Linum usitatissimum*

Basierend auf der Bildung von L-Malat aus Oxalacetat, unter Oxidation des Cosubstrates NADH, wurde die MDH-Aktivität über den optischen Test photometrisch bestimmt (siehe Kapitel 2.2.8.5). Die Konzentrierung des Enzyms im Medium erfolgte mit Centriprep-Konzentratoren. Die Extraktion der MDH erfolgte mit MC-Ilvaine-Puffer (40 mmol/L, pH 5,6). Die Zellsuspensionskulturen wurden für die Bestimmungen der MDH-Aktivität 14 Tage nach der Inokulation geerntet. Angegeben sind Mittelwerte aus zwei Bestimmungen von jeweils zwei verschiedene Kulturkolben. Dargestellt ist die Aktivität in nkat/g TG und in Prozent, wobei die Aktivität in den Zellen gleich 100 % gesetzt wurde.

Tabelle 10: Vergleich der Aktivitäten von NADH:Malatdehydrogenase, Linustatinase und Linamarase im Kulturmedium der Zellsuspensionskulturen

Die Gesamtaktivitäten (100 %) entsprechen der Summe aller Enzym-Aktivitäten aus dem Medium und den Zellextrakten.

Tabelle 11: Aktivitäten der Linamarase und Linustatinase in ganzen Zellen und Protoplasten der Zellsuspensionskulturen

Die Aktivitätsbestimmungen der Linamarase und Linustatinase erfolgten nach den Angaben in Kapitel 2.2.8.2 und 2.2.8.3. Das Enzym wurde mit einem Mc Ilvaine-Puffer (40 mmol/L, pH 5,6; 2 mmol/L Na-Ascorbat) bzw. diesem Puffer, der 1,2 M Kochsalz enthält, aus den Zellen extrahiert. Die Protoplasten wurden, wie in Kapitel 2.2.8.1.3 beschrieben, isoliert. Nachdem nachgewiesen wurde, dass an der intakten Protoplastenfraktion von außen keine Linamarase oder Linustatinase anhaftet, wurden die Protoplasten osmotisch geschockt und für die Aktivitätsbestimmungen, wie in Kapitel 2.2.8.2 und 2.2.8.3 beschrieben, eingesetzt. MDH: NADH:Malatdehydrogenase.

Tabelle 12: Konzentration cyanogener Glucoside in den Zellen der Zellsuspensionskultur nach 16 Stunden Inkubation mit appliziertem Linustatin

Die Inkubation der Zellsuspensionen erfolgte unter Standardbedingungen mit zugesetzter Natronlaugevorlage (siehe Kapitel 2.2.9.1). Zu Beginn der Inkubation wurden dem Medium 200 µmol/L Linustatin zugesetzt. Die Zellen wurden nach 16 Stunden Inkubation schockgefroren, und wie in Kapitel 2.2.7.8.1 methanolisch extrahiert. Die Analyse der cyanogenen Glucoside erfolgte über ein HPLC-System mit RP-18 Säule (siehe Kapitel 2.2.9).

Tabelle 13: Konzentration cyanogener Glucoside in den Wurzeln der Flüssigkultur nach 22 Stunden Inkubation mit appliziertem Linustatin

Die Inkubation der Wurzelflüssigkulturen erfolgte unter Standardbedingungen mit zugesetzter Natronlaugevorlage (siehe Kapitel 2.2.9.1). Zu Beginn der Inkubation wurden dem Medium 200 µmol/L Linustatin zugesetzt. Die Wurzeln wurden nach 22 Stunden Inkubation schockgefroren, und wie in Kapitel 2.7.8.1 beschrieben methanolisch extrahiert. Die Analyse der cyanogenen Glucoside erfolgte über ein HPLC-System mit einer RP-18 Säule (siehe Kapitel 2.2.9).